



Universidade de Aveiro Departamento de química
Ano 2012

**SARA MARGARIDA
FERNANDES DA
HORTA**

**ESTUDO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E
MONÓCITOS EM ESCLEROSE SISTÉMICA**



**SARA MARGARIDA
FERNANDES DA
HORTA**

**ESTUDO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E
MONÓCITOS EM ESCLEROSE SISTÉMICA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica com especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, Assessor do Centro de Histocompatibilidade do Centro e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família que sempre me apoiou em todas as
minhas escolhas.

o júri

presidente

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora auxiliar convidada do departamento de química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Luís Miguel Borrego

Professor auxiliar convidado do departamento de imunologia da Universidade Nova de Lisboa

Doutor Artur Augusto Paiva

Assessor do Centro de Histocompatibilidade do Centro

Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues

Professora auxiliar convidada do departamento de química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Um muito obrigado ao Doutor Artur Paiva pela oportunidade dada e conhecimento transmitido.

Obrigado à Doutora Rosário Domingues por todo o carinho e preocupação, não só como orientadora mas também como professora e aliada ao longo de todo o mestrado.

A toda a equipa da citometria de fluxo, em especial ao Tiago Carvalheiro, pela paciência inesgotável em ajudar-me nesta longa jornada.

Às médicas do HUC, Dr. Mariana e Dr. Maria João, pela colaboração e apoio neste trabalho.

Às minhas colegas de laboratório por todos os momentos passados em conjunto. Em especial à Cláudia e Mariana, pela alegria, amizade, e todas as risadas dadas na biblioteca.

Obrigado aos meus amigos por todo o apoio, ajuda e carinho. Vocês estarão eternamente no meu coração.

À minha família, em especial aos meus Pais, Mário e In, pelo apoio incondicional ao longo de todos estes anos, por me compreenderem e suportarem todas as minhas decisões.

palavras-chave

Autoimunidade, Esclerose Sistémica, Células dendríticas, Monócitos, Citocina, Quimocina

resumo

A Esclerose Sistémica é uma doença reumática rara na qual se observa uma reação autoimune contra ao tecido conjuntivo. A etiologia desta doença permanece ainda desconhecida, contudo é atualmente aceite que fatores ambientais e uma predisposição genética estão na base do seu desenvolvimento. Existem dois subtipos de Esclerose Sistémica, limitada e difusa, e ambos envolvem três processos característicos e inter-relacionados: dano vascular, reação autoimune e fibrose. As células dendríticas e monócitos são células envolvidas na apresentação antigénica e estudos publicados no âmbito de diversas doenças autoimunes demonstram a ativação crónica e presença abundante nos locais de lesão. Deste modo, procedeu-se ao estudo do envolvimento das diferentes subpopulações de monócitos e células dendríticas no sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica e respetivo controlo, recorrendo para tal à técnica de citometria de fluxo. Mais especificamente, foram realizadas: a quantificação em percentagem e valor absoluto das subpopulações de monócitos e células dendríticas; quantificação da frequência de monócitos e células dendríticas a produzir IL-6, IL-8, CXCL10 e CCL4; quantificação de ICAM-1 expressa nas subpopulações de monócitos e células dendríticas. Os resultados mais relevantes deste estudo foram o aumento da percentagem e valor absoluto de monócitos CD16⁺ e células dendríticas CD16⁺ em doentes com Esclerose Sistémica, sobretudo na presença de úlceras digitais e de acordo com a duração da doença; aumento da frequência de células produtoras de IL8 e CCL4 em doentes com Esclerose Sistémica, principalmente com fibrose pulmonar e com o subtipo difuso; diminuição de ICAM-1 expressa em monócitos e células dendríticas em doentes do subtipo difuso. Deste modo, foi demonstrado que os monócitos e células dendríticas detêm um papel importante na fisiopatologia da Esclerose Sistémica, podendo ser aplicados na monitorização da severidade desta doença debilitante.

keywords

Autoimmunity, Systemic Sclerosis, Dendritic cell, Monocyte, Cytokine, Chemokine

abstract

Systemic Sclerosis is a rare rheumatic disease characterized by an autoimmune reaction against conjunctive tissue. The etiology of this disease remains unknown, however it is presently accepted that environmental factors and genetic predisposition may be involved on its start. Two distinct subtypes are known for this disease, limited and diffused, both involving three correlated processes - vascular damage, autoimmune reaction and fibrosis. Monocytes/macrophages and dendritic cells are cells involved on antigen presentation and published data about several autoimmune diseases show that these cells are chronically activated and present abundantly at damaged areas. In this way, a study has been performed about the involvement of different subpopulations of monocytes and dendritic cells on the peripheral blood of Systemic Sclerosis patients and of a control population, using the flow cytometry. Specifically, the following quantifications have been performed: percentile and absolute value of monocyte and dendritic cell subpopulations; IL-6, IL-8, CXCL10 and CCL4 production frequency by monocytes and dendritic cells; ICAM-1 expression in the monocyte and dendritic cell subpopulations. The most relevant results obtained of this study were: the increase in frequency and absolute value of CD16⁺ monocytes and CD16⁺ dendritic cells in Systemic Sclerosis patients, that is more visible the longer the patient has been diagnosed, and in the presence of digital ulcers; increase of IL8 and CCL4 production frequency in Systemic Sclerosis patients, mostly in those with pulmonary fibrosis and those of the diffuse type; decrease of ICAM-1 expression in monocytes and dendritic cells in diffuse type patients. In this way, it has been proved that monocytes and dendritic cells have an important role on Systemic Sclerosis physiopathology and could be used to monitor the severity of this debilitating disease.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
A. Sistema Imune: Características gerais	3
A. 1. Células Apresentadoras de Antígenos	5
A. 1. 1. Reconhecimento antígeno pelas Células Apresentadoras de Antígenos.....	6
A. 1. 2. Processamento e apresentação de antígenos via Complexo Major de Histocompatibilidade	8
A. 1. 2. 1. Complexo Major de Histocompatibilidade: Glicoproteínas indispensáveis na apresentação antigénica.....	9
A. 1. 3. Sinapse imunológica: Interação entre o complexo peptídeo-Complexo Major de Histocompatibilidade e recetor da célula T para o antígeno	11
A. 2. APCs profissionais: Divergência no reconhecimento e apresentação	12
A. 2. 1. Monócitos	12
A. 2. 1. 1. Monócitos: Hematopoiese	14
A. 2. 1. 2. Monócitos: Recrutamento de monócitos para os tecidos periféricos.....	15
A. 2. 1. 3. Monócitos: Diferentes subtipos e funcionalidades na imunidade	17
A. 2. 2. Células Dendríticas: As mais eficientes células apresentadoras de antígenos	19
A. 2. 2. 1. Células Dendríticas: A origem e desenvolvimento de uma população multifacetada	21
A. 2. 2. 2. Células Dendríticas: Maturação e controlo da imunidade	22
A. 2. 2. 3. Células Dendríticas: Os diversos subtipos	26
A. 2. 2. 3. 1. Célula dendrítica mielóide	28
A. 2. 2. 3. 2. Célula dendrítica CD16 ⁺	29
A. 2. 2. 3. 3. Célula dendrítica plasmacitóide.....	30
B. Autoimunidade e doenças autoimunes	32
B. 1. Esclerose Sistémica	33
B. 1. 1. Esclerose Sistémica: Principais fatores envolvidos.....	34
B. 1. 2. Esclerose Sistémica: Fisiopatologia	35
B. 1. 2. 1. Esclerose Sistémica: Envolvimento de monócitos na autoimunidade	39
B. 1. 2. 2. Esclerose Sistémica: Envolvimento das células dendríticas na autoimunidade ..	40
II. OBJETIVOS.....	43
III. MATERIAL & MÉTODOS	47
A. Caracterização da população em estudo	49

B. Caracterização da frequência de monócitos e células dendríticas no sangue periférico	49
C. Análise funcional de monócitos e células dendríticas	50
C. 1. Estimulação <i>in vitro</i> com LPS e INF- γ de monócitos e células dendríticas.....	50
C. 2. Marcação intracitoplasmática para detetar a produção de citocinas.....	50
D. Aquisição por Citometria de Fluxo	51
E. Análise estatística	51
IV. RESULTADOS.....	55
A. Quantificação de monócitos no sangue periférico	57
A. 1. Frequência de monócitos no sangue periférico em Doentes com SSc de acordo com o subtipo, presença de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais.....	57
A. 2. Frequência de monócitos no sangue periférico em Doentes com SSc de acordo com a duração da doença.....	57
B. Quantificação de células dendríticas no sangue periférico	58
B. 1. Frequência de células dendríticas no sangue periférico em Doentes com SSc de acordo com o subtipo, presença de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais	58
B. 2. Frequência de células dendríticas no sangue periférico em Doentes com SSc de acordo com a duração da doença.....	59
C. Frequência de citocinas e quimocinas expressas em monócitos e células dendríticas no sangue periférico	60
C. 1. Frequência de citocinas e quimocinas expressas de acordo com o subtipo da doença.....	60
C. 2. Frequência de citocinas e quimocinas expressas de acordo com a presença de fibrose pulmonar ou episódios de úlceras digitais.....	63
C. 3. Frequência de citocinas e quimocinas expressas de acordo com a duração da doença....	67
D. Frequência de ICAM-1 (CD54) expressa monócitos e células dendríticas no sangue periférico	70
D. 1. Frequência de ICAM-1 (CD54) expressa de acordo com o subtipo de SSc, presença de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais	70
D. 2. Frequência de ICAM-1 (CD54) expressa de acordo com a duração da doença.....	70
V. DISCUSSÃO	73
A. Quantificação de monócitos e células dendríticas do sangue periférico de doentes com SSc	75

B. Expressão de citocinas e quimocinas em monócitos e células dendríticas no sangue periférico de doentes com SSc	78
C. Expressão de ICAM-1 em monócitos e células dendríticas no sangue periférico de doentes com SSc	79
VI. CONCLUSÃO.....	81
VII. BIBLIOGRAFIA.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 – Imunidade inata e adquirida. Os mecanismos da imunidade inata providenciam a defesa inicial contra uma infecção.** A resposta adquirida desenvolve-se mais tarde, com a ativação dos linfócitos. Imagem adaptada de [3].....5
- Figura 2 – Processamento e apresentação de antígenos exógenos e endógenos.** a) O antígeno exógeno é ingerido por fagocitose ou endocitose, entrando de seguida na via de processamento endocítico, onde é degradado em pequenos peptídeos. Por fim, é apresentado com uma molécula de MHC classe II na membrana da APC. b) O antígeno endógeno é degradado segunda a via de processamento citosólico e posteriormente guiado para o interior do retículo endoplasmático, onde se liga a uma molécula de MHC classe I. Imagem adaptada de [3].....9
- Figura 3 – Moléculas de MHC classe I e classe II.** A molécula de MHC classe I é constituída por uma molécula α com três domínios distintos, dos quais os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são responsáveis pela ligação ao peptídeo, e uma molécula β . A molécula de MHC classe II é constituída por dois domínios α e dois domínios β , sendo os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ que se fixam ao peptídeo. Imagem adaptada de [3].....10
- Figura 4 – Sinapse imunológica entre APCs e células T.** O primeiro sinal corresponde à apresentação do antígeno peptídico, no contexto da molécula de MHC, que é reconhecido por TCR específico ao antígeno. O segundo sinal envolve a estabilização da sinapse através de moléculas de adesão e gera sinais via moléculas co-estimuladoras presentes na superfície de moléculas das APCs e células T. O terceiro sinal é produzido pela ligação de citocinas libertadas pelas APCs a recetores de citocinas nas células T com o objetivo de os polarizar num fenótipo efetor particular. Imagem adaptada de [28].12
- Figura 5 – Morfologia dos monócitos.** a) imagem de um monócito num esfregaço de sangue periférico, fotografado através de um microscópio ótico. b) imagem de um monócito num esfregaço de sangue periférico, fotografado através de um microscópio eletrónico. Imagem adaptada [1].....13
- Figura 6 – Linhagem de fagócitos monocleares.** A diferenciação em monócito e posteriormente em macrófago e célula dendrítica (DC16⁺) ocorre no estadio do progenitor de macrófago e DC (MDP). Legenda: CMP, progenitor mielóide comum; GMP, progenitor de granulócito e macrófago; HSC, célula estaminal hematopoética. Imagem adaptada de [42].....15
- Figura 7 – Recrutamento de monócitos para os tecidos periféricos.** O recrutamento de monócitos para a matriz extracelular encontra-se subdividido em diversas etapas,

nomeadamente, a fase de rolamento, mediada pela interação entre as selectinas e respetivos ligandos, em que os monócitos rolam ao longo do epitélio. As quimocinas presentes na superfície das células epiteliais vão interagir com os seus recetores nos monócitos que se encontram em rolamento, ativando as integrinas desta mesma célula. Como resultado observa-se uma adesão mais forte dos monócitos ao endotélio que por fim levará à sua imobilização e posterior migração através do endotélio. Imagem adaptada de [48].16

Figura 8 – Nomenclatura dos monócitos no sangue. Os diferentes tipos de monócitos encontram-se representados com símbolos distintos que representam os marcadores cruciais das respetivas subpopulações de células. O gancho azul representa CD14 enquanto que o quadrado laranja representa CD16. O elevado número de um símbolo indica a elevada densidade desse mesmo recetor e as setas representam a relação de desenvolvimento. Isto não significa que o desenvolvimento realmente ocorre nos compartimentos do sangue. Imagem adaptada de [61].19

Figura 9 – Morfologia da célula dendrítica. A imagem corresponde a uma das primeiras fotografias publicadas de DCs no baço de rato por *Steinman e colaboradores* [76].20

Figura 10 – Desenvolvimento de células dendríticas a partir de precursores hematopoiéticos. Estudos realizados aos precursores mielóides e precursores linfóides demonstraram que destes, os precursores que expressavam o recetor FLT3 possuíam uma elevada capacidade de formar DCs. Considerando-se assim que tanto as DCs convencionais encontradas nos órgãos linfóides como as DCs plasmacitóides podem ser geradas a partir de qualquer tipo de precursor FLT3⁺. Imagem adaptada de [85].22

Figura 11 – Características que mudam durante a maturação das DCs. Imagem adaptada de [16].24

Figura 12 – Influência do tipo de microrganismos, reconhecidos no local de ativação, na polarização das células dendríticas. As células dendríticas imaturas (DCs) podem ser polarizadas por diferentes tipos de PAMPs, definidos como 1, 2 e regulatórios ou fatores tecidulares para se tornarem maduras, promovendo o desenvolvimento das células T *naïve* em Th1, Th2 ou T reguladoras. Uma exceção é que certos agentes patogénios podem inibir a maturação de DC, resultando em DCs imaturas regulatórias. Imagem adaptada de [106].25

Figura 13 – Resumo esquemático da fisiopatologia da Esclerose Sistémica (SSc). A fisiopatologia da SSc pode envolver uma predisposição genética juntamente com algum fator ambiental desconhecido. Uma vez iniciada, os sucessivos fatores na fisiopatologia da SSc envolve alterações na via vascular, imunológica e fibrótica. Imagem adaptada de [168].38

Figura 14 – Expressão anormal de marcadores de superfície e citocinas/quimocinas na SLE. Imagem adaptada de [193].	39
Figura 15 - Representação gráfica da estratégia utilizada para identificar as subpopulações de células dendríticas e monócitos mediante a utilização dos anticorpos monoclonais anti-HLA-DR, -CD16, -CD123, -CD11c, -CD33, -CD14 e -CD45. As diferentes subpopulações encontram-se representadas a diferentes cores: monócitos CD16⁻ (azul escuro), monócitos CD16⁺ (azul claro), DCs mielóides (cor de rosa), DCs CD16⁺ (cor de laranja), DCs plasmacitóides (verde).	53
Figura 16 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) a produzir CCL4 e CXCL10 na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc, sem estímulo <i>in vitro</i>. a) difuso <i>versus</i> controlo, p<0,05; b) limitado <i>versus</i> controlo, p<0,05; c) limitado <i>versus</i> difuso, p<0,05.	61
Figura 17 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) a produzir IL-6, IL-8, CCL4 e CXCL10 na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc, após estímulo <i>in vitro</i> com LPS e IFN-γ. a) difuso <i>versus</i> controlo, p<0,05; b) limitado <i>versus</i> controlo, p<0,05; c) limitado <i>versus</i> difuso, p<0,05.	61
Figura 18 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc, sem estímulo <i>in vitro</i>. a) limitado <i>versus</i> controlo, p<0,05; b) difuso <i>versus</i> limitado, p<0,05.	62
Figura 19 - Representação da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc, após estímulo <i>in vitro</i> com LPS e IFN-γ. a) difuso <i>versus</i> controlo, p<0,05; b) limitado <i>versus</i> controlo, p<0,05.	62
Figura 20 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) a produzir CCL4 e CXCL10 na população controlo e em doentes com SSc na presença/ausência de PF, sem estímulo <i>in vitro</i>. a) com PF <i>versus</i> controlo, p<0,05; b) sem PF <i>versus</i> controlo, p<0,05.	63
Figura 21 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) a produzir IL-6, IL-8, CCL4 e CXCL10 na população controlo e em doentes com SSc na presença/ausência de PF, após estímulo <i>in vitro</i> com LPS e IFN-γ. A) com PF <i>versus</i> controlo, p<0,05; b) sem PF <i>versus</i> controlo, p<0,05; c) com PF <i>versus</i> sem PF, p<0,05.	64

- Figura 22 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) na população controle e em doentes com SSc na presença/ausência de PF, sem estímulo *in vitro*. a) com PF *versus* controle, $p < 0,05$, b) sem PF *versus* controle, $p < 0,05$64**
- Figura 23 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) na população controle e em doentes com SSc na presença/ausência de PF, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . a) com PF *versus* controle, $p < 0,05$, b) sem PF *versus* controle, $p < 0,05$; c) com PF *versus* sem PF, $p < 0,05$65**
- Figura 24 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) a produzir CCL4 e CXCL10 na população controle e em doentes com SSc na presença/ausência de DU, sem estímulo *in vitro*. a) com DU *versus* controle, $p < 0,05$; b) sem DU *versus* controle, $p < 0,05$; c) com DU *versus* sem DU, $p < 0,05$65**
- Figura 25 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) a produzir IL-6, IL-8, CCL4 e CXCL10 na população controle e em doentes com SSc na presença/ausência de DU, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . A) com DU *versus* controle, $p < 0,05$; b) sem DU *versus* controle, $p < 0,05$66**
- Figura 26 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) na população controle e em doentes com SSc na presença/ausência de DU, sem estímulo *in vitro*. A) com DU *versus* controle, $p < 0,05$; b) sem DU *versus* controle, $p < 0,05$67**
- Figura 27 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) na população controle e em doentes com SSc na presença/ausência de du, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . A) com DU *versus* controle, $p < 0,05$; b) sem DU *versus* controle, $p < 0,05$; c) com DU *versus* sem DU, $p < 0,05$67**
- Figura 28 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) a produzir CCL4 e CXCL10 nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos, sem estímulo *in vitro*.68**
- Figura 29 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) a produzir IL-6, IL-8, CCL4 e CXCL10 nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . a) ≤ 1 anos *versus* > 10 anos, $p < 0,05$; b) ≤ 1 anos *versus* $> 1 - \leq 10$ anos, $p < 0,05$68**

Figura 30 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos, sem estímulo *in vitro*.....69

Figura 31 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . a) ≤ 1 anos *versus* $>1-\leq 10$ anos, $p<0,05$; b) ≤ 1 anos *versus* >10 anos.69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes tipos de tirs e respetivas moléculas reconhecidas. Informação obtida dos artigos [10, 15].	7
Tabela 2 – Anticorpos monoclonais utilizados para o estudo do fenótipo dos monócitos e células dendríticas. A quantidade adicionada de cada anticorpo monoclonal foi de acordo com as instruções do fabricante.	52
Tabela 3 – Anticorpos monoclonais utilizados para o estudo de expressão de citocinas nos monócitos e células dendríticas. A quantidade adicionada de cada anticorpo monoclonal foi de acordo com as instruções do fabricante.	52
Tabela 4 – Anticorpos monoclonais utilizados para a identificação das citocinas nos monócitos e células dendríticas. A quantidade adicionada de cada anticorpo monoclonal foi de acordo com as instruções do fabricante.	52
Tabela 5 - Média±desvio padrão da frequência no total da celularidade (%) e valor absoluto (cel/µl) do total de monócitos e frequência relativa da subpopulação de CD14⁺CD16⁺ (% subtipo) no total de monócitos, no sangue periférico da população controlo e de doentes com SSc. Os doentes foram subdivididos de acordo com o subtipo; com a presença de fibrose pulmonar (PF) e pela ocorrência ou não de episódios de úlceras digitais (DU).	57
Tabela 6 - Média±desvio padrão da frequência no total da celularidade (%) e valor absoluto (cel/µl) do total de monócitos e frequência relativa da subpopulação de CD14⁺CD16⁺ (% subtipo) no total de monócitos no sangue periférico da população controlo e de doentes com SSc. Os doentes com SSc foram divididos de acordo com a duração da doença, em anos.	58
Tabela 7 - Média±desvio padrão da frequência no total da celularidade (%) e valor absoluto (cel/µl) do total de DCs e frequência relativa das subpopulações mielóide, plasmacitóide e CD16⁺ (% subtipo) no total de DCs no sangue periférico da população controlo e de doentes com SSc. Os doentes foram subdivididos de acordo com o subtipo; com a presença de fibrose pulmonar (PF) e por fim pela ocorrência ou não de episódios de úlceras digitais (DU).	59
Tabela 8 - Média±desvio padrão da frequência no total da celularidade (%) e valor absoluto (cel/µl) do total de dcs e frequência relativa das subpopulações mielóide, plasmacitóide e CD16⁺ (% subtipo) no total de dcs no sangue periférico da população controlo e de doentes com ssc. Os doentes com SSc foram divididos de acordo com a duração da doença, em anos.	60

Tabela 9 - Média±desvio padrão da quantidade de ICAM-1 (CD54) expressa por célula (MFI) na população controlo e doentes com SSc. Os doentes foram subdivididos de acordo com o subtipo; com a presença de fibrose pulmonar (PF) e por fim pela ocorrência ou não de episódios de úlceras digitais (DU).70

Tabela 10 - Média±desvio padrão da quantidade de ICAM-1 (CD54) expressa por célula (MFI) na população controlo e doentes com SSc, divididos de acordo com a duração da doença.....71

Tabela 11 – Características clinicas dos doentes com SSc.ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.

Abreviaturas

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BDCA	Antígeno das Células Dendríticas do Sangue
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
DC	Célula Dendrítica
DU	Úlceras Digitais
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito e macrófago
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ICAM-1	Molécula de Adesão InterCelular-1
IFN	Interferão
IL	Interleucina
IP-10	Proteína induzida por Interferão gamma
LFA-1	Antígeno associado à função linfocitária 1
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína Quimotática de Monócito-1
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
PAH	Hipertensão Arterial Pulmonar
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PF	Fibrose Pulmonar
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PSGL-1	Ligando-1 da glicoproteína p-selectina
SLE	Lúpus Eritematoso Sistêmico

SRC	Crise Renal Esclerodermia
SSc	Esclerose sistêmica
TCR	Recetor da Célula T
Th	Células T <i>helper</i>
TGF	Fator de Crescimento Transformante
TLR	Recetor do tipo <i>toll</i>
TNF	Fator de Necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
VCAM-1	Molécula de Adesão Célula Vascular ¹

I. INTRODUÇÃO

A. Sistema Imune: Características gerais

O termo **imunidade** é derivado da palavra latina *immunis* (*exempt* ≈ *isento*), que na Era Romana se referia à proteção dos senadores romanos, durante o seu mandato, contra processos jurídicos [1]. Atualmente, a palavra imunidade refere-se ao somatório de todos os mecanismos de defesa que o nosso organismo dispõe para nos proteger das agressões internas e externas a que estamos sujeitos todos os dias [2]. Para tal, desenvolvemos um sistema imunológico uno e integrado, composto por um leque variado de células e moléculas solúveis, que interatuam e funcionam sinergicamente, descrevendo uma resposta coletiva e coordenada com o intuito de eliminar ou neutralizar o estímulo agressor.

A observação de que indivíduos que recuperaram de determinadas infeções ficavam posteriormente protegidos dessa mesma doença, descrito inicialmente por Edward Jenner em 1798, permitiu o crescimento da disciplina de imunologia. Desde então tem havido uma transformação impressionante na nossa compreensão do sistema imunológico e das suas funções [3]. O que conhecemos hoje sobre o sistema imune humano é o resultado da evolução, ao longo de milhões de anos, de organismos vertebrados e invertebrados, e corresponde a um sistema de defesa altamente versátil que evoluiu com o intuito de proteger os animais de microrganismos patogénios invasores e de outras alterações que perturbem a sua homeostase [4]. Para isso, o nosso sistema imune desenvolve uma resposta intitulada de **resposta imune**.

A resposta imune pode ser definida como a reação defensiva do nosso organismo, mediada por células singulares, contra organismos invasores ou moléculas estranhas que afetem a sua normal atividade [4].

Funcionalmente, a resposta imune pode ser dividida em diversas etapas – **reconhecimento**, **resposta** e **memória** [3]. Inicialmente, o sistema imune procede à identificação do organismo invasor, com a ajuda de **células apresentadoras de antígenos** (*Antigen-Presenting cells* – APCs). Uma vez reconhecido o agente patogénico, o sistema imune recruta uma variedade de células e moléculas dos tecidos linfóides, com o objetivo de organizar uma resposta apropriada direcionada contra o alvo, *resposta efetora*. A exposição a um determinado organismo permite criar uma memória imunológica que, no futuro, se refletirá numa resposta mais rápida e eficaz caso ocorra contacto com esse mesmo organismo [3].

Segundo os agentes envolvidos, considera-se que no sistema imunológico humano subsistem dois tipos de respostas inter-relacionadas: a **resposta inata**, de largo espectro menos específica, e a **resposta adaptativa**, restrita e mais específica [2].

A **imunidade inata** (também chamada de imunidade natural ou nativa) é definida como a linha de defesa inicial que o nosso organismo dispõe contra infecções. Os mecanismos da imunidade natural já existiam antes do estabelecimento da infecção e são específicos para estruturas comuns a grupos de microrganismos semelhantes, não conseguindo distinguir diferenças discretas entre substâncias estranhas. Assim sendo, a imunidade inata responde rapidamente, numa fração de horas, e sempre da mesma forma a infecções consecutivas [1]. O seu funcionamento apoia-se em diversos componentes, nomeadamente, **barreiras físicas e químicas**, tais como o epitélio e as substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais; **células**, nomeadamente células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e células apresentadoras de antígenos (macrófago, células dendríticas e monócitos); **proteínas efetoras circulantes**, incluindo frações do sistema complemento e outros mediadores da inflamação; **citocinas**, que regulam e coordenam várias atividades das células da imunidade natural [3].

Em contraste com a imunidade inata, existem outras respostas imunológicas que são estimuladas pela exposição a agentes infecciosos e cuja magnitude e capacidade defensiva aumentam com exposições posteriores a um microrganismo em particular. Como essa forma de imunidade se desenvolve em resposta a infecções e se adapta à infecção, é chamada de **imunidade adaptativa** ou **adquirida** [1, 2]. Ao contrário da resposta imune inata, a resposta do sistema imune adaptativo não é a mesma para todos os membros de uma espécie mas sim para antígenos específicos, e apenas é observada dias após o reconhecimento do antígeno [3]. Os principais membros da imunidade adaptativa são os linfócitos e de acordo com o seu papel na resposta imune subdividem a imunidade adaptativa em **imunidade celular** e **imunidade humoral**. Os principais efetores da imunidade celular são os linfócitos T que medeiam a defesa do organismo através da interação com outras células e por libertação de peptídeos solúveis, as **citocinas**. As citocinas, por sua vez, têm a capacidade de ativar diversas células fagocíticas, que desta forma eliminam os microrganismos e células infetadas de modo mais eficiente. Relativamente à imunidade humoral, os principais efetores são os linfócitos B que após contacto antígeno e diferenciação em plasmócitos secretam **anticorpos** contra o antígeno alvo. Os anticorpos libertados ao ligarem-se ao antígeno presente no microrganismo facilitam a sua eliminação ou neutralizam a sua ação. Por outro lado, a ligação do anticorpo ao antígeno pode ativar o sistema do complemento, resultando na lise do organismo invasor [4]. Todo este processo encontra-se representado na **Figura 1**.

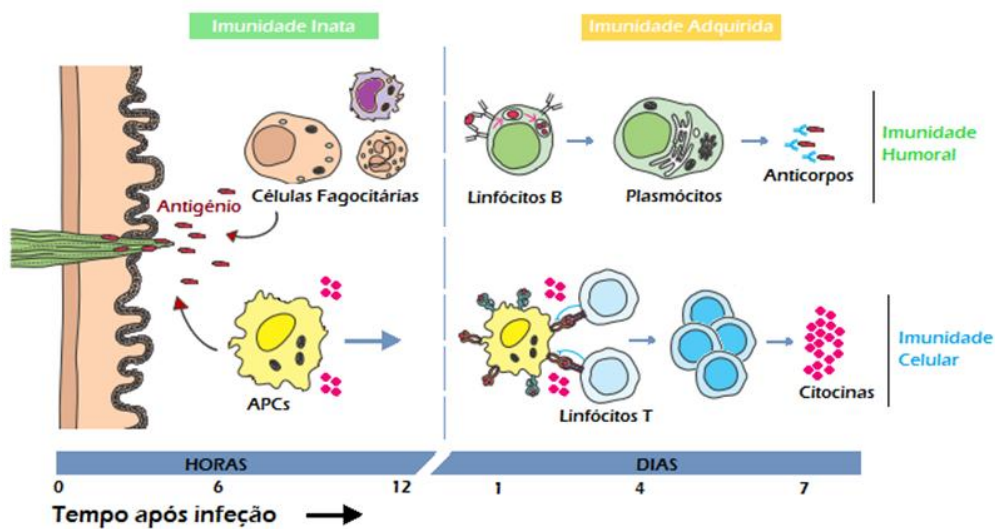


Figura 1 – Imunidade inata e adquirida. Os mecanismos da imunidade inata providenciam a defesa inicial contra uma infecção. A resposta adquirida desenvolve-se mais tarde, com a ativação dos linfócitos. Imagem adaptada de [3].

Assim, para que ocorra uma resposta imunológica adequada e específica contra agentes agressores é necessário que haja colaboração entre os diversos intervenientes do nosso sistema imune. Esta resposta necessita da cooperação entre duas populações celulares: células apresentadoras de antígeno, especializadas na apresentação do antígeno e consecutiva ativação da resposta imune, e linfócitos que são as células efetoras que eliminam os agentes desencadeadores da resposta imunológica. No contexto deste trabalho apenas serão abordadas as células apresentadoras de antígenos.

A. 1. Células Apresentadoras de Antígenos

O desenvolvimento e manutenção de uma resposta imune adaptativa é mediado pelo tráfego de linfócitos T através de diferentes tecidos e órgãos e subseqüentes interações destas células com outras células do sistema imune [5]. Para que tal ocorra, é necessário que o antígeno estranho seja capturado e a sua região ativa ou **epítopo** seja apresentada na membrana de uma célula, juntamente com uma molécula do **complexo maior de histocompatibilidade** (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) [3]. As células que desempenham esse papel são chamadas de **células apresentadoras de antígenos** (*Antigen Presenting Cells* - APCs) [6].

Até certo ponto, qualquer célula nucleada tem a capacidade de processar e apresentar antígenos a populações específicas de linfócitos T [7]. Contudo, existem alguns tipos de células que, quer pela expressão característica de moléculas de MHC e

moléculas co-estimuladoras [3], quer pela elevada eficiência em internalizar e processar antígenos, são consideradas **APCs profissionais** [2]. Estas incluem as células dendríticas (*Dendritic Cell* – DC), os linfócitos B e os monócitos, estes últimos diferenciam-se posteriormente em macrófagos [6]. Para além das células referidas, existem outras populações celulares com capacidade de apresentar antígenos, nomeadamente, as células endoteliais, enterócitos, hepatócitos, fibroblastos, assim como algumas células tumorais, e denominam-se de **APCs não profissionais** [2].

A. 1. 1. Reconhecimento antigénico pelas Células Apresentadoras de Antígenos

Descrito inicialmente por *Charles Janeway Jr* [8], o sistema imune inato tem a capacidade de detetar a presença de organismos perigosos através do reconhecimento de **padrões moleculares associados a patógenos** (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* - PAMPs), recorrendo para isso a recetores codificados na linha germinal que Janeway intitulou como **recetores de reconhecimento de padrões** (*Pattern-Recognition Receptor* – PRRs) [9]. Mais propriamente, os PAMPs correspondem as estruturas moleculares comumente partilhadas por diversos microrganismos, como por exemplo **lipopolissacarídeo** (*Lipopolysaccharide* - LPS) e RNA viral, que são indispensáveis para a virulência e sobrevivência do agente patogénico [10]. Desta forma encontram-se ausentes em células eucariotas e o seu reconhecimento, através de PRRs presentes em APCs, conduz à indução de sinais envolvidos na ativação do sistema imune adaptativo.

Pelo facto de as células que compõem o sistema imune adaptativo não disporem de recetores que consigam diferenciar entre antígenos estranhos e antígeno do próprio organismo, a imunidade adaptativa é controlada por PRRs, que ditam o tipo, magnitude e duração da resposta a um determinado microrganismo [11, 12]. É importante salientar que nem todos os PRRs possuem a mesma capacidade de desencadear a resposta imune adaptativa. Enquanto que alguns PRRs, nomeadamente **recetores do tipo toll** (*Toll-Like Receptors* - TLRs), são eficientes na indução de respostas mediadas por linfócitos T e B, outros PRRs, como por exemplo os recetores de manose e recetores *scavenger*, não são capazes de induzir a imunidade adaptativa por eles próprios [12].

Os TLRs correspondem a uma família de recetores transmembranares do tipo I, caracterizados por um domínio extracelular de **repetições ricas em leucina** e um domínio extracelular **recetor toll/IL-1** [13]. Estes recetores desempenham um papel crucial no reconhecimento de uma bactéria e promovem a ativação de diferentes cascatas de sinalização intracelular que culminam com a ativação dos fatores de transcrição, e concludentemente no *uptake* de antígenos solúveis, complexos solúveis e formas

fagocitáveis de antígenos [14]. Até à data, foram identificados onze membros da família dos TLR responsáveis pelo reconhecimento de distintos PAMPs derivados de diversos microrganismos [15], representados na **Tabela 1**.

Para além destes, outros recetores envolvidos na captação de antígenos são expressos pela maioria das APCs, nomeadamente, recetores para as **imunoglobulinas G**: FcγRs (FcγRIII/CD16, recetor de baixa afinidade; FcγRII/CD32, recetor de baixa a moderada afinidade e FcγRI/CD64, receptor de alta afinidade); recetores para **imunoglobulinas E**: FcεRs (FcεRI, receptor de alta afinidade e FcεRII/CD23, recetor de baixa afinidade); recetores do complemento: CD11b (CR3), CD11c e CD35 (CR1); recetores scavenger, como a SCARB3 (CD36), envolvidos na fagocitose de células apoptóticas ou necróticas [16, 17].

Ultrapassada a etapa de reconhecimento, as APCs procedem à captura e processamento do antígeno alvo com a finalidade de apresentar o seu determinante antigénico a populações de linfócitos específicas.

Tabela 1 – Diferentes tipos de TLRs e respetivas moléculas reconhecidas. Informação obtida dos artigos [10, 15].

TLRs - Recetores do tipo <i>toll</i>		
	Tipos	Antígenos reconhecidos
Extracelular	TLR1	Triacil-lipopeptídeos (Complexado com TLR2)
	TLR2	Peptidoglicanos, lipopeptídeos, lipoproteínas de bactérias Gram-positivas, lipopeptídeos de micoplasma e parede celular de fungos.
	TLR4	LPS de bactérias Gram-negativas e ácido lipoteicoico de bactérias Gram-positivas
	TLR5	Flagelina bacterial
	TLR6	Diacil-lipopeptídeos (Complexado com TLR2)
	TLR11	Componentes desconhecidos de bacterias uropatógenicas e moléculas semelhantes a profilina do parasita <i>Toxoplasma gondii</i>
Intracelular	TLR3	RNA de cadeia dupla
	TLR7	Moléculas sintéticas semelhantes a imidazoquinolina, análogos de guanosina, RNA de cadeia simples e pequenos fragmentos de RNA (<i>small interfering RNA</i>)
	TLR8	RNA de cadeia simples, Imidazoquinolina e oligonucleotídeos de DNA portadores de <i>polyG</i> .
	TLR9	Motivos de CpG não metilados de genoma viral e bacteriano

A. 1. 2. Processamento e apresentação de antígenos via Complexo Major de Histocompatibilidade

Para que os linfócitos T reconheçam e desenvolvam uma resposta imune contra microrganismos invasores ou células infetadas, é necessário que as APCs apresentem primeiro, aos linfócitos, os peptídeos que permitam reconhecer essas mesmas células [18]. Para tal, é necessário que estes mesmos antígenos sejam primeiro capturados e degradados em unidades mais pequenas (**processamento antigénico**) e posteriormente complexados com moléculas do MHC no interior da célula. Depois de formado, o complexo peptídeo-MHC é transportado para a superfície de membrana das APCs, onde é apresentado à população de linfócitos T alvo, que apenas reconhecerá os antígenos para os quais tem recetor específico (*T cell receptor* - **TCR**) [6]. A conversão de antígenos endógenos e exógenos em peptídeos imunogénicos reconhecidos pelos linfócitos T envolve uma série de eventos proteolíticos e outros eventos enzimáticos que culminam na formação de peptídeos ligados a moléculas MHC classe I e classe II [19], descrito na **Figura 2**. Resumidamente, uma proteína que provenha do meio extracelular, **antígeno exógeno**, é ingerida aquando o seu reconhecimento e digerida por enzimas hidrolíticas segundo uma via de processamento endocítico. Os pequenos peptídeos resultantes deste processo são *a posteriori* complexados com moléculas do MHC de classe II e apresentados na membrana da APC. No caso de um antígeno que tenha sido produzido pela própria célula, **antígeno endógeno**, este é degradado segundo a via de processamento citosólico e posteriormente unido com uma molécula do MHC da classe I. Por último, este complexo peptídeo-MHC de classe I é apresentado à superfície da APC [3].

Nas maioria das APCs tem sido sugerida a capacidade de **apresentação cruzada de antígenos** na qual antígenos fagocitados, que são normalmente expressos e apresentados pela via MHC de classe II, podem escapar para o citosol e serem processados por proteossomas e importados pela via MHC de classe I [20]. Tal como será descrito no próximo capítulo, este processo de apresentação cruzada permite às células T CD8⁺, um subtipo de linfócitos classificado como citotóxico, de reconhecerem também peptídeos exógenos expressos por moléculas MHC classe I.

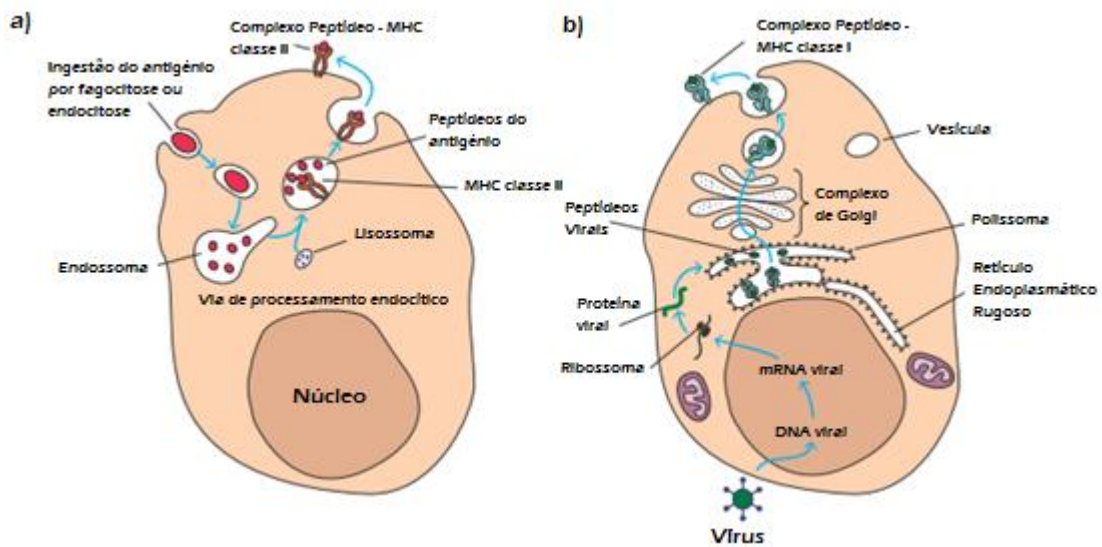


Figura 2 – Processamento e apresentação de antígenos exógenos e endógenos. a) O antígeno exógeno é ingerido por fagocitose ou endocitose, entrando de seguida na via de processamento endocítico, onde é degradado em pequenos peptídeos. Por fim, é apresentado com uma molécula de MHC classe II na membrana da APC. b) O antígeno endógeno é degradado segunda a via de processamento citosólico e posteriormente guiado para o interior do retículo endoplasmático, onde se liga a uma molécula de MHC classe I. Imagem adaptada de [3].

A. 1. 2. 1. Complexo Major de Histocompatibilidade: Glicoproteínas indispensáveis na apresentação antígenoica

As moléculas de MHC classe I e classe II, também chamados de **antígenos leucocitários humanos** (*Human Leucocyte Antigen* – HLA), são glicoproteínas transmembranares que funcionam como recetores que ligam e apresentam peptídeos a populações de linfócitos T $CD8^+$ e $CD4^+$, respetivamente, através da interação com o recetor da célula T para o antígeno ou TCR [21, 22].

Tal como é visível na **Figura 2**, as moléculas de MHC classe I e classe II associam-se a peptídeos que foram processados em diferentes compartimentos intracelulares. As moléculas de MHC de classe I, presentes em quase todas as células com núcleo, ligam-se a peptídeos derivados de antígenos endógenos que foram processados no citoplasma da célula. Por outro lado, as moléculas de MHC de classe II, expressas primariamente nas APCs profissionais, ligam-se a peptídeos derivados de antígenos exógenos que foram internalizados por fagocitose e endocitose e processados pela via endocítica [19].

Estruturalmente são também observadas diferenças entre estas duas classes de glicoproteínas transmembranares que, na resposta imunológica, se traduz na seletividade do seu reconhecimento por parte dos linfócitos T, **Figura 3**.

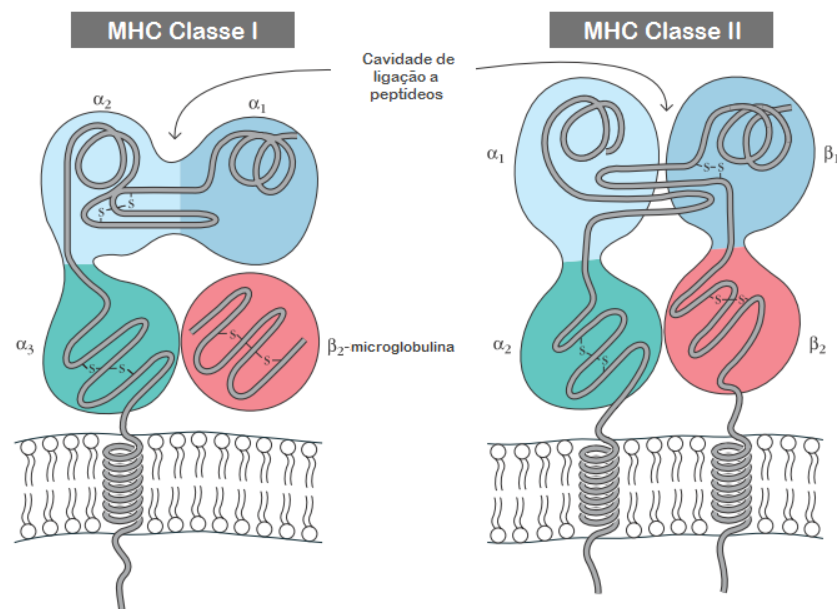


Figura 3 – Moléculas de MHC classe I e classe II. A molécula de MHC classe I é constituída por uma molécula α com três domínios distintos, dos quais os domínios α_1 e α_2 são responsáveis pela ligação ao peptídeo, e uma molécula β . A molécula de MHC classe II é constituída por dois domínios α e dois domínios β , sendo os domínios α_1 e β_1 que se fixam ao peptídeo. Imagem adaptada de [3].

As moléculas de MHC classe I são compostas por uma cadeia polipeptídica α transmembranar organizada em três domínios extracelulares (α_1 , α_2 , α_3) que se encontram ligados não-covalentemente a uma cadeia peptídica β leve designada de β_2 -microglobulina (β_{2m}). Os domínios α_1 e α_2 da cadeia pesada formam a cavidade onde se ligam peptídeos de 8-11 aminoácidos e o domínio α_3 é responsável pela interação com o recetor CD8. Os linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ só reconhecem assim determinantes antígenicos apresentados por moléculas MHC classe I pelo facto de a molécula acessória CD8 interagir com o domínio α_3 [23].

As moléculas de MHC-II consistem de uma cadeia polipeptídica α pesada transmembranar com dois domínios extracelulares (α_1 e α_2) e de uma cadeia polipeptídica β pesada transmembranar com dois domínios extracelulares (β_1 e β_2). Os segmentos α_1 e β_1 da molécula de MHC de classe II formam uma cavidade onde se liga o peptídeo de 13-18 aminoácidos e o β_2 é o domínio que contém a alça que serve como sítio de ligação para a molécula CD4. Assim, este tipo de glicoproteína apenas é reconhecido por linfócitos T portadores da molécula acessória CD4 e está também envolvida no controlo da diferenciação de células B [23, 24].

Os genes que codificam estas glicoproteínas encontram-se representados na região 6p21.31 do cromossoma 6 e a expressão de ambas as classes é co-dominante, isto é, ocorre expressão tanto dos alelos herdados da mãe como dos herdados pelo pai

[25]. Os genes que codificam para as moléculas de MHC de classe I humanas mais relevantes do ponto de vista de resposta imune são aqueles que codificam para a cadeia pesada α das moléculas HLA-A, HLA-B e HLA-C. Os genes MHC classe II mais relevantes são os que codificam as cadeias pesadas α e β das moléculas HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR [23].

A 1. 3. Sinapse imunológica: Interação entre o complexo peptídeo-Complexo Major de Histocompatibilidade e recetor da célula T para o antígeno

Perante uma resposta imune, a comunicação entre as APCs e os linfócitos T, intitulada de **sinapse imunológica** [26], resume-se à transmissão de três sinais entre estas duas populações celulares, esquematizado na **Figura 4**.

O primeiro sinal envolve a apresentação de antígenos associados a moléculas do MHC de classe II, que facilita o reconhecimento do antígeno pelas células T através do seu TCR. Para que as células T específicas ao antígeno se tornem ativas e esta população expanda clonalmente, um segundo sinal deve ser gerado através da interação entre moléculas de adesão e co-estimulatórias presentes na APC, como CD54, CD80 e CD86 entre outras, com os seus ligandos nas células T como CD28, e **antígeno associado à função linfocitária 1**. O terceiro sinal corresponde à secreção de citocinas pelas APCs, que direciona a diferenciação dos linfócitos específicos contra o antígeno em diferentes subtipos de células T efetoras [27, 28]. A criação de um ambiente de citocinas particular por APCs durante a imunidade é crítico para a determinação de um tipo apropriado de resposta imune, que pode ser tanto mediado por células como por anticorpos [28].

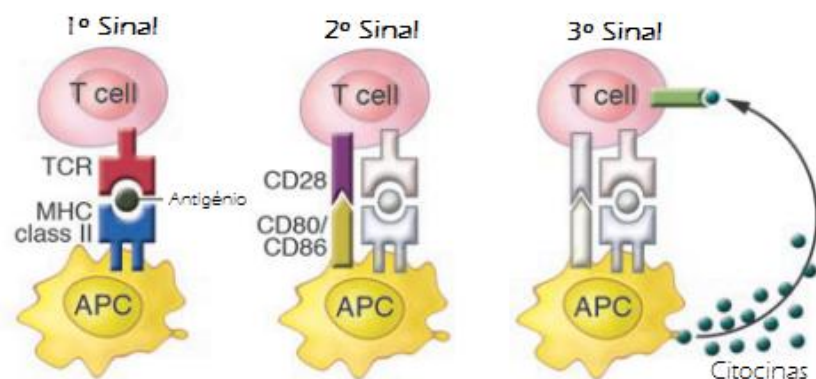


Figura 4 – Sinapse imunológica entre APCs e células T. O primeiro sinal corresponde à apresentação do antígeno peptídico, no contexto da molécula de MHC, que é reconhecido por TCR específico ao antígeno. O segundo sinal envolve a estabilização da sinapse através de moléculas de adesão e gera sinais via moléculas co-estimuladoras presentes na superfície de moléculas das APCs e células T. O terceiro sinal é produzido pela ligação de citocinas libertadas pelas APCs a receptores de citocinas nas células T com o objetivo de os polarizar num fenótipo efetor particular. Imagem adaptada de [28].

A. 2. APCs profissionais: Divergência no reconhecimento e apresentação

Dos diferentes tipos celulares que agem como APCs profissionais, registam-se diferenças não só de morfologia e estrutura do seu citoesqueleto como também diferenças nas suas propriedades moleculares, nomeadamente nos padrões de expressão de moléculas de adesão e secreção de citocinas quimotáticas - **quimocinas** [29]. Assim sendo, apesar de todas estas células terem capacidade de apresentar antígeno aos linfócitos T, a sua função e o momento em que atuam na resposta imune é distinto.

As células dendríticas são as APCs mais eficientes e as únicas capazes de iniciar respostas das células T, ativando tanto células T CD4⁺ e como T CD8⁺ *naïve*. Os macrófagos, por outro lado, apresentam antígenos a células T CD4⁺ diferenciadas, na fase efetora da imunidade celular, e os linfócitos B apresentam antígenos às células T CD4⁺ durante a resposta imunológica humoral [6].

A presente monografia irá centrar-se nas duas principais populações de APCs profissionais que podem ser encontradas no sangue periférico: células dendríticas, as mais eficazes do sistema imunitário, e os monócitos, que após migração para os tecidos periféricos se diferenciam em macrófagos.

A. 2. 1. Monócitos

Os monócitos são leucócitos circulantes provenientes da linhagem mielóide que medeiam essencialmente funções na imunidade inata incluindo fagocitose e produção de

citocinas [30]. Estas células são formadas a partir de precursores da medula óssea e libertadas para o sangue periférico onde permanecem durante alguns dias. Após estímulos metabólicos, imunes e pro-inflamatório, os monócitos migram para os tecidos periféricos, onde ocorre a diferenciação em **macrófagos** e **células dendríticas** (*Dendritic Cell* - DC), contribuindo para a defesa do hospedeiro e remodelação e reparação dos tecidos [31, 32] .

A morfologia dos monócitos na circulação periférica é heterogênea e estas células constituem aproximadamente 5-10% dos leucócitos presentes no sangue periférico no ser humano. Em humanos e ratos, os monócitos têm algumas características morfológicas típicas tal como o tamanho celular irregular, núcleos ovais ou em forma de rim e vesículas citoplasmáticas, contudo, em extremos de variação, podem confundir-se com granulócitos, linfócitos, *natural killers* (NK) e células dendríticas [31]. Na **Figura 5** encontra-se representado um monócito no sangue periférico, fotografado em diferentes microscópios.

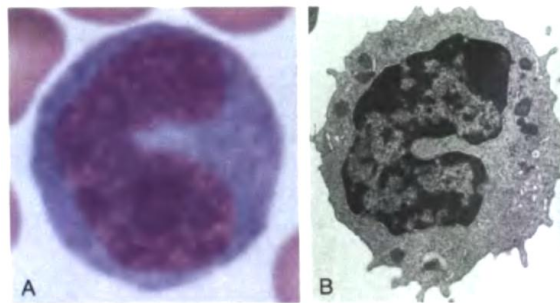


Figura 5 – Morfologia dos monócitos. a) Imagem de um monócito num esfregaço de sangue periférico, fotografado através de um microscópio ótico. b) Imagem de um monócito num esfregaço de sangue periférico, fotografado através de um microscópio eletrónico. Imagem adaptada [1].

De entre as diversas funções que se encontram associados a este tipo de células, salienta-se o papel dos monócitos como efetores inatos na resposta imune, mediando a defesa antimicrobiana do hospedeiro através da eliminação de agentes invasores por fagocitose e produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), óxido nítrico (NO), mieloperoxidase e citocinas inflamatórias [33, 34]. Por outro lado, evidências experimentais têm revelado uma notável multipotência dos monócitos em diferentes ambientes inflamatórios, encontrando-se implicados em diversas doenças inflamatórias, incluindo aterosclerose e Lúpus Eritematoso Sistémico [35]. Em algumas circunstâncias eles podem desencadear e polarizar as respostas de células T e podem também contribuir para a reparação de tecidos e neovascularização [36]. Os monócitos têm ainda

a capacidade de tanto estimular como suprimir as repostas dos linfócitos T perante infeções e doenças autoimunes [36, 37].

A apresentação antigénica tem sido descrita como uma característica clássica de monócitos, mas desde a identificação de diferentes subtipos de DCs, os monócitos tem sido considerados como menos eficientes que as DCs na apresentação antigénica [16]. Uma outra função bem conhecida desta população de células é o de reservatório sistémico de precursores mielóides para a renovação de macrófagos e células dendríticas em determinados tecidos [38]. Contudo, a diferenciação de monócitos em DCs é maioritariamente observada em condições inflamatórias, por exemplo, durante uma infeção ativa, e evidências indicam que a renovação de macrófagos e DCs nos tecidos não é confiada apenas aos monócitos [39]. É importante salientar que o estudo das funções dos monócitos humanos em processos biológicos é ainda uma tarefa difícil uma vez que procedimentos de isolamento, purificação em gradientes e cultura *in vitro* destas células afetam notavelmente o seu fenótipo e comportamento [30]. Embora seja claro que os monócitos sejam precursores das linhagens de macrófagos e DCs, as vias de desenvolvimento e diferenciação permanecem ainda muito pouco estudadas *in vivo* [31].

Atualmente sabe-se que os monócitos são equipados de um largo conjunto de recetores que reconhecem lípidos e diversos microrganismos, e após estimulação, podem produzir elevadas concentrações de ROS; prostaglandinas; citocinas como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10; fator de crescimento endotelial vascular; enzimas proteolíticas; encontrando-se assim envolvidos na defesa contra patógenos [33, 40]. Nos próximos capítulos será descrito com mais pormenor o desenvolvimento desta população de células fagocíticas assim como os tipos até hoje descritos e principais momentos de ação.

A. 2. 1. 1. Monócitos: Hematopoiese

O sistema mononuclear-fagocítico é definido como uma linhagem de células hematopoiéticas derivadas de células precursoras na medula óssea, e é composto por monócitos, macrófagos e células dendríticas [41, 42]. As células hematopoiéticas desenvolvem-se a partir de células estaminais multipotentes presentes na medula óssea, e até à sua formação, passam por diversos estádios de progenitores intermédios, que no modelo prevalente, corresponde ao estadio progenitor mielóide comum (CMP), progenitor de granulócito/macrófago (GMP), e progenitor macrófago/DC (MDP) [44]. Tal como é visível na **Figura 6**, os monócitos descendem do progenitor MDP e tanto podem

diretamente participar como efetores da resposta imune como diferenciar-se em macrófagos e DCs.

Para que ocorra o desenvolvimento de monócitos a partir de células estaminais na medula óssea, é necessário que ocorra a seleção de um programa de expressão de genes específicos que sucessivamente restringem o potencial de desenvolvimento da célula [43]. Os fatores de transcrição são tidos como os responsáveis pela escolha de destinos das células e, no que diz respeito aos monócitos [30], o fator de crescimento Csf-1 [44] e o fator de transcrição PU.1 [45] acarretam um papel determinante neste processo.

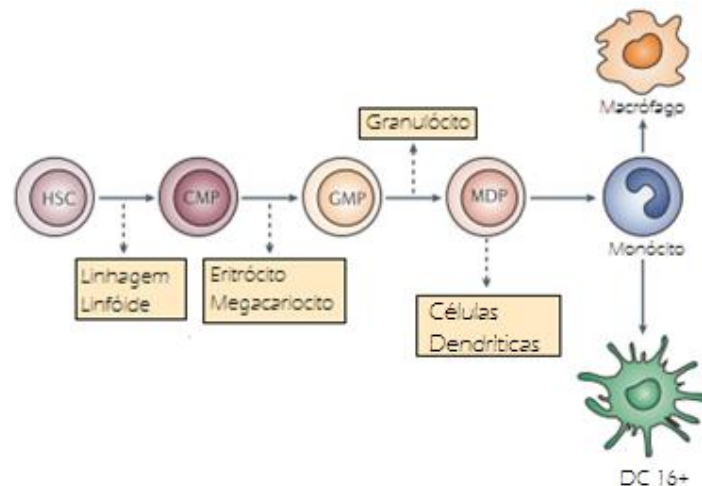


Figura 6 – Linhagem de fagócitos monocleares. A diferenciação em monócito e posteriormente em macrófago e célula dendrítica (DC16+) ocorre no estágio do progenitor de macrófago e DC (MDP). Legenda: CMP, Progenitor Mielóide Comum; GMP, Progenitor de Granulócito e Macrófago; HSC, Célula Estaminal Hematopoética. Imagem adaptada de [42].

A. 2. 1. 2. Monócitos: Recrutamento de monócitos para os tecidos periféricos

A capacidade do monócito se mobilizar para onde é necessário é central na sua função de promover a defesa imune durante a infecção e de conduzir doenças inflamatórias [46]. Após ativação por um estímulo antigénico nos tecidos periféricos, eles podem contribuir para a resolução local do dano ou podem migrar para os órgãos linfóides secundários [47]. Apesar de a migração dos monócitos do sangue para os tecidos e dos tecidos para os gânglios linfáticos na ausência de um estímulo permanecer ainda controverso na literatura, em todos os casos, o recrutamento de monócitos requer a interação deste com as células epiteliais. A sua mobilização para os tecidos onde ocorreu o dano é um processo de múltiplas etapas orquestradas por vários tipos diferentes de moléculas e têm sido alvo de inúmeros estudos [47]. Todo o processo de migração dos monócitos encontra-se representado na **Figura 7**.

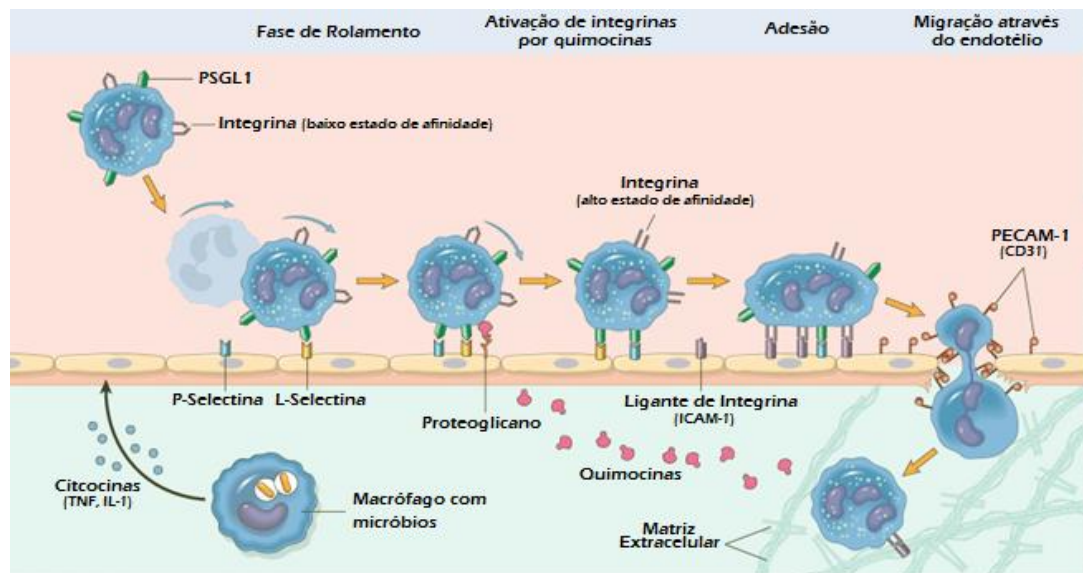


Figura 7 – Recrutamento de monócitos para os tecidos periféricos. O recrutamento de monócitos para a matriz extracelular encontra-se subdividido em diversas etapas, nomeadamente, a fase de rolamento, mediada pela interação entre as selectinas e respetivos ligandos, em que os monócitos rolam ao longo do epitélio. As quimocinas presentes na superfície das células epiteliais vão interagir com os seus recetores nos monócitos que se encontram em rolamento, ativando as integrinas desta mesma célula. Como resultado observa-se uma adesão mais forte dos monócitos ao endotélio que por fim levará à sua imobilização e posterior migração através do endotélio. Imagem adaptada de [48].

Quando se desenvolve uma resposta inflamatória, variadas citocinas como IL-1 e TNF- α e outros mediadores da inflamação, libertados por sentinelas como os macrófagos, atuam nos vasos sanguíneos adjacentes ao local do dano. Em resposta a este estímulo, as células endoteliais aumentam rapidamente a expressão à superfície de diversas moléculas de adesão, particularmente dois tipos de específicos de **selectinas**, selectina P e selectina E. Os monócitos por outro lado expressam à sua superfície glicoproteínas capazes de se ligarem a estas selectinas, mais propriamente **ligando-1 da glicoproteína p-selectina** (*P-selectin glycoprotein ligand-1* - PSGL-1) (CD162), e outra selectina com capacidade de interagir com glicoproteínas presentes nos endotélios, a **selectina L** (CD62L) [49, 50]. Apesar de ter aumentando o número de moléculas de adesão expostas à superfície das principais células intervenientes, as interações selectina – ligando-de-selectina são de baixa afinidade, com uma taxa de afastamento rápida, e são facilmente rompidas pela força de cisalhamento do sangue. Como resultado, o monócito desprende repetitivamente e liga-se novamente aos ligandos presentes nas células endoteliais, rolando ao longo da superfície endotelial. No tecido inflamado, são também libertadas quimocinas como **CCL2** (*Monocyte Chemotactic Protein-1* - MCP-1) e **CCL4** (*Macrophage Inflammatory Protein-1 β* - MIP-1 β) que são transportadas para a superfície luminal das células endoteliais das vénulas pós-capilares

[47]. Nessa localização, as quimocinas ao ligarem-se a recetores específicos na superfície dos leucócitos em fase de rolamento, aumentam a afinidade das **integrinas** presentes na sua superfície pelos ligandos, resultando num aumento da ligação, mediada pelas integrinas, dos leucócitos à superfície endotelial. Em paralelo com a ativação das integrinas, as citocinas (TNF- α e IL-1) também aumentam a expressão endotelial de ligandos das integrinas, principalmente **moléculas de adesão da célula vascular-1** (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1* - VCAM-1) (CD106) e **molécula de adesão intercelular-1** (*Intercellular Adhesion Molecule 1* - ICAM-1) (CD54) [50]. O resultado dessas alterações é que os monócitos fixam-se firmemente ao endotélio, o seu citoesqueleto é reorganizado e espalham-se sobre a superfície endotelial.

As quimocinas atuam então sobre os leucócitos aderentes e estimulam as células a migrar através dos espaços inter-endoteliais segundo o gradiente de concentração química. Outras proteínas expressas nos leucócitos e nas células endoteliais, nomeadamente a **molécula de adesão da plaqueta e célula endotelial** (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 - PECAM-1) (CD31), desempenham um papel nessa migração através do endotélio [46]. Os leucócitos presumivelmente produzem enzimas que os capacitam a passar através da rede vascular, acumulando-se no tecido extravascular em torno dos agentes patogénios.

A. 2. 1. 3. Monócitos: Diferentes subtipos e funcionalidades na imunidade

Desde há muito tempo que os monócitos são conhecidos mas, até recentemente, eram considerados primariamente como células transicionais cuja principal função era repopular macrófagos nos tecidos.

Na década de 80, *Yasaka e colaboradores* [51] e outros grupos de investigação [52-55] demonstraram a existência de heterogeneidade morfológica e funcional desta população de células sanguíneas. Coletivamente este trabalho mostrou a presença de um subtipo clássico dominante que expressava o co-recetor de lipopolissacarídeos associado ao TL4 (CD14). Os autores distinguiram assim duas subpopulações de acordo com a expressão deste recetor: uma subpopulação mais predominante e morfológicamente maior (CD14⁺), que possui uma maior atividade fagocítica, expressão de mieloperoxidase e elevada libertação superóxidos; e um subtipo menos abundante e morfológicamente menor e menos denso que não expressa CD14, com menor capacidade fagocítica e de expressão de peroxidase. Por outro lado, esta subpopulação de monócitos expressava níveis elevados de HLA-DR, IFN- α e IL-1 e tinha capacidade de mediar citotoxicidade dependente de anticorpos. Uma serie de estudos conduzidos mais

tarde focaram-se em definir os subtipos de monócitos humanos de acordo com os antígenos expressos na sua superfície celular [56]. Com base na expressão de FcγR-I (CD64), dois grandes subtipos foram identificados – o CD64⁺, correspondentes a monócitos de maior tamanho, com capacidade fagocítica e inflamatória, e o CD64⁻, monócitos raros, pequenos e elevada capacidade de apresentação antigénica [57, 58]. Uma segunda linha de investigação focou-se na expressão de FcγR-III (CD16) [59] e demonstrou que a maior parte dos monócitos eram CD16⁻, expressavam HLA-DR em baixa quantidade, eram altamente fagocíticos e inflamatórios, e expressavam o recetor da quimocina CCL2, o CCR2. Em detrimento, o subtipo CD16⁺ era menos abundante e expressava HLA-DR⁺, CCR2⁻ e CCR5⁺. Desde a descoberta que os monócitos CD16⁻ podiam iniciar a expressão de CD16 e que os macrófagos expressam CD16, foi postulado que o subtipo CD16⁺ era uma versão mais madura dos monócitos CD16⁻ [60]. Os monócitos CD16⁺ foram classificados como pro-inflamatórios devido à sua capacidade de produzir TNF-α em resposta a LPS e estudos subsequentes tem demonstrado que este subtipo pode diferenciar-se em células dendríticas. Respondem à fractalkina (CX₃CL₁), e aumentam a sua expressão sob várias condições de *stress* e doença [61-64].

O trabalho do grupo de *Grage-Griebenow* demonstrou que os monócitos CD16⁺ são compostos por pelo menos duas populações com funções inquestionavelmente diferentes [56]. Os monócitos que expressam CD16 e CD14 (CD14⁺CD16⁺) também expressam os recetores Fc CD64 e CD32, tem atividade fagocítica e são inteiramente responsáveis pela produção de TNF-α e IL-1 em resposta ao LPS [65]. Em contraste, os monócitos que expressam CD16 e baixos níveis de CD14 (CD14^{dim}CD16⁺) não expressam os outros recetores, apresentam baixa capacidade fagocítica e não produzem TNF-α ou IL-1 em resposta a LPS [66]. A função dos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ permanece ainda indefinida [67].

O subtipo CD14⁺⁺CD16⁻ possui uma maior capacidade fagocítica mas baixa produção de citocinas em comparação com o subtipo de monócitos que expressam CD16 [68]. Esta população CD14⁺⁺CD16⁻ representa 80 a 90% dos monócitos sanguíneos, expressam níveis elevados do recetor de quimocina CCR2 e baixos níveis de CX₃CR₁, e produzem mais IL-10 que TNFα e IL-1 em resposta a LPS *in vitro* [69, 70]. Em contraste com o este subtipo, os monócitos CD16⁺ expressam elevados níveis de CX₃CR₁ e baixos níveis de CCR2, são responsáveis pela produção de TNF-α em resposta à estimulação por LPS e são chamados de pro-inflamatórios [62]. Diversos estudos têm descrito que os monócitos CD16⁺ são encontrados em grande número no sangue de doentes com inflamação aguda e doenças infecciosas [71, 72].

Assim, considera-se atualmente a existência de três populações de monócitos, definidas pela expressão de CD14 e CD16: a) $CD14^{++}CD16^{-}$ ou monócito clássico, b) $CD14^{++}CD16^{+}$ ou monócito intermédio e c) $CD14^{dim}CD16^{+}$ ou monócito não-clássico, representadas na **Figura 8**.

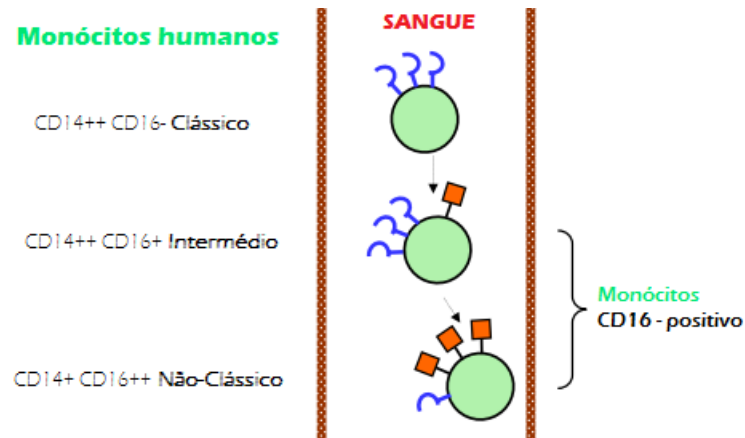


Figura 8 – Nomenclatura dos monócitos no sangue. Os diferentes tipos de monócitos encontram-se representados com símbolos distintos que representam os marcadores cruciais das respetivas subpopulações de células. O gancho azul representa CD14 enquanto que o quadrado laranja representa CD16. O elevado número de um símbolo indica a elevada densidade desse mesmo recetor e as setas representam a relação de desenvolvimento. Isto não significa que o desenvolvimento realmente ocorre nos compartimentos do sangue. Imagem adaptada de [61].

A. 2. 2. Células Dendríticas: As mais eficientes células apresentadoras de antígenos

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígeno especializadas que atuam como mediadores essenciais na **imunidade**, contendo a capacidade única de iniciar e regular respostas imunes contra antígenos estranhos [73]; e de induzir **tolerância** nas células T aos antígenos do próprio, evitando aparecimento de respostas autoimunes [74, 75].

As DCs correspondem apenas a 1-2% do total de leucócitos no sangue periférico [76] e manifestam uma forma e motilidade diferente das outras células sanguíneas. *In situ*, como na pele, órgãos linfóides e vias respiratórias, estas células são estreladas e quando isoladas e expostas em lâminas, demonstram inúmeras dendrites, sendo o termo “dendrítica” proveniente da sua semelhança morfológica com as extensões dendríticas dos neurónios, **Figura 9** [16].



Figura 9 – Morfologia da célula dendrítica. A imagem corresponde a uma das primeiras fotografias publicadas de DCs no baço de rato por *Steinman e colaboradores* [76].

As DCs recém-geradas de precursores da medula óssea migram, através da corrente sanguínea, para os tecidos não linfóides onde eventualmente se tornam células residentes. Aqui, promovem um sistema sentinela nas superfícies do corpo como a pele, faringe, esôfago superior, vagina, cérvix e ânus e também nas superfícies internas ou mucosas nomeadamente o sistema gastrointestinal e respiratório [77], considerando-se atualmente que cada órgão possui a sua própria população de DCs [78]. Após hospedagem nos tecidos, as células dendríticas permanecem num estado imaturo até que, após receção de um estímulo ambiental ou endógeno [79], migram para os gânglios linfáticos cujo fim se resume na ativação dos linfócitos T [83].

Inicialmente observadas como célula de Langerhans na pele, em 1868 por *Paul Langerhans*, a caracterização das células dendríticas começou apenas há 40 anos após a sua descoberta no baço de ratos, por *Ralph Steinman e colaboradores* [76, 80, 81]. A observação de que leucócitos semelhantes se encontravam em tecidos não-linfóides de tanto roedores como humanos [82], combinado com evidências recentes que sugeriam que eles desempenhavam um importante papel na rejeição de transplantes do coração e rim assim como nas respostas imunes [82], gerou um elevado interesse nas DCs. Contudo a baixa frequência no corpo e a falta de marcadores específicos para esta população celular acarretou problemas na purificação de DCs assim como abrandou o processo da sua caracterização [83]. Devido à junção da função que as DCs realizam entre a periferia, onde os agentes patogénios aparecem; e os gânglios linfáticos, onde a imunidade é induzida; estas células são vistas como as intervenientes chave do sistema imune [16, 78]. Deste modo, a sua manipulação parece ser um caminho possante no tratamento de doenças infecciosas persistentes, neoplasias, doenças autoimunes e alergias [79, 84].

A. 2. 2. 1. Células Dendríticas: A origem e desenvolvimento de uma população multifacetada

A determinação das vias de desenvolvimento das células dendríticas tem provado ser uma área de investigação difícil e controversa. O facto de as DCs serem células raras e os precursores correspondentes serem ainda mais escassos, torna o seu isolamento e sequente estudo difíceis [85].

As células dendríticas, como todos os outros leucócitos, correspondem a uma população heterogénea que, salvo algumas exceções [86], se desenvolve de células estaminais hematopoiéticas derivadas da medula óssea [87]. A linhagem mielóide e linfóide divergem nos eventos iniciais da hematopoiese sendo que os monócitos, macrófagos, granulócitos, megacariócitos e eritrócitos diferenciam-se a partir do progenitor mielóide comum (CMP), enquanto que as células NK, linfócitos T e B se diferenciam do progenitor linfóide comum (CLP). Originalmente, as DCs eram consideradas como sendo células mielóides todavia estudos recentes demonstraram que estas células podem desenvolver-se não apenas de progenitores mielóides como também de progenitores linfóides [88]. A primeira sugestão de que estas APCs especializadas se encontravam relacionadas com a linhagem linfóide proveio do facto de marcadores linfóides típicos como CD2, CD8 e CD25 (IL2R α) serem encontrados à superfície de DCs do timo e subtipos de DCs no baço [89, 90]. Estudos conduzidos mais tarde demonstraram que estes dois progenitores apresentavam um potencial semelhante em originar ambos os tipos de DCs do baço assim como as DCs do timo [91]. Porém, o facto de os precursores mielóides serem numericamente dominantes na medula óssea leva a crer que as DCs presentes nos gânglios linfáticos ou baço sejam de origem mielóide, do mesmo modo que no timo, onde os precursores linfóides são dominantes, a maioria das DCs seja de origem linfóide [85].

De acordo com o progenitor a que derivam, as células dendríticas são intituladas como **DCs mielóides**, provenientes do progenitor mielóide comum (CMP) e deste modo, identificadas pela expressão de marcadores específicos a esta linhagem celular, como CD33 e CD13; e **DCs linfoplasmacitóides** ou apenas **plasmacitóides** que derivam do progenitor linfóide comum (CLP), e num último estadio partilham o progenitor com as células NK. Estas últimas são identificadas pela ausência de marcadores de células mielóide CD33 e expressão forte de CD4 e CD123. Considera-se atualmente que esta derivação não é fixa, na medida em que sobre diversos estímulos os progenitores da linhagem mielóide podem originar DCs plasmacitóides [88]. Juntamente a estes dois subtipos de DCs, encontra-se citado na literatura um subtipo de células dendríticas

definidas como **CD16⁺14⁺** ou **derivadas de monócitos** cuja ontogenia permanece ainda por elucidar [92].

Estudos direcionados para as células progenitoras capazes de se diferenciarem em células dendríticas, tanto da linhagem mielóide como da linhagem linfóide, constataram que todas elas partilhavam a expressão à superfície do recetor **FLT3** (*FMS-related tyrosine kinase 3*) [88], **Figura 10**. McKenna e colaboradores observaram que ratos privados do ligando FLT3 desenvolviam baixos níveis de DCs [93], igualmente observado em roedores deficientes em **STAT3** (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) [94], uma importante molécula na cascata de sinalização do FLT3L. Reciprocamente, administração de FLT3L a ratos ou humanos produz níveis excecionalmente elevados de DCs [95]. Assim considera-se que todas as células progenitoras expressão FLT3, o que permite acesso ao programa de diferenciação das DCs que pode ser usado caso nenhum outro sinal competitivo ocorra [96].

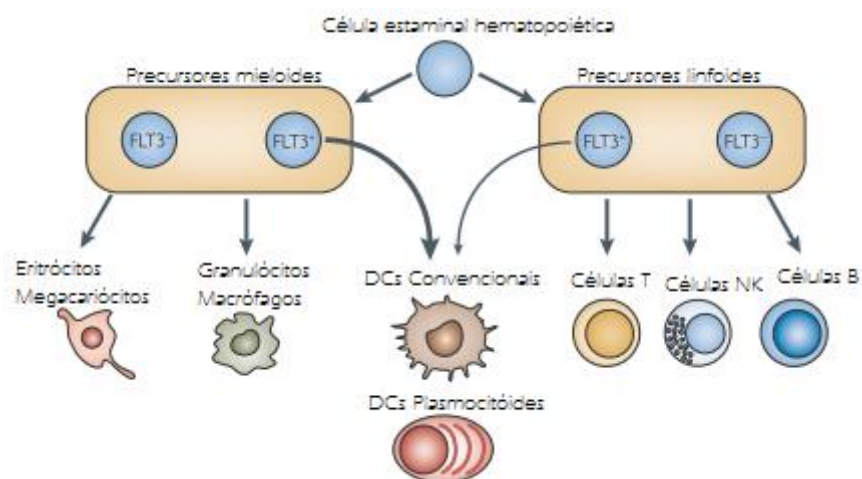


Figura 10 – Desenvolvimento de células dendríticas a partir de precusores hematopoiéticos. Estudos realizados aos precusores mielóides e precusores linfóides demonstraram que destes, os precusores que expressavam o recetor FLT3 possuíam uma elevada capacidade de formar DCs. Considerando-se assim que tanto as DCs convencionais encontradas nos órgãos linfóides como as DCs plasmocitóides podem ser geradas a partir de qualquer tipo de precursor FLT3⁺. Imagem adaptada de [85].

A. 2. 2. 2. Células Dendríticas: Maturação e controlo da imunidade

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos que capturam e transferem informações do mundo exterior para as células do sistema imune adaptativo [97]. Famosas pelas suas propriedades estimulatórias nas células T, as DCs são também conhecidas pelos seus efeitos no crescimento das células B e secreção de imunoglobulinas [98] assim como na indução da tolerância imunológica [99]. São assim

APCs únicas, cujas suas duas funções chave ocorrem ao longo do tempo – primeiro lidar com antígenos e depois, como DCs maduras, um ou dois dias mais tarde, estimular as células T [16].

Na maior parte dos tecidos, as células dendríticas encontram-se no estado imaturo, especializadas na captura e processamento de antígenos e incapazes de estimular as células T. Embora estas células não contenham os sinais acessórios necessários para a ativação das células T, como CD40, CD54 e CD86, estão extremamente bem equipadas na captura antigénica [16, 97]. Após a deteção de um antígeno com a ajuda dos PRRs, as DCs podem internalizar as partículas ou micróbios por **fagocitose** ou podem formar grandes vesículas pinocíticas com o fluido extracelular e solutos, **macropinocitose**. Todo este processo de *uptake* antigénico torna a apresentação antigénica das DCs tão eficiente que concentrações picomolares e nanomolares de antígeno são suficientes para o seu sucesso, muito menos que os níveis micromolares necessários para outras APCs [97]. Contudo, após a apresentação antigénica, que causa maturação das DCs, estas características sofrem uma regulação negativa correspondente à diminuição da expressão de recetores fagocíticos/endocíticos. Pelo contrário ocorre aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias CD40, CD54, CD80 e CD86, moléculas do MHC, alterações da morfologia como a reorganização do citoesqueleto e aquisição de elevada motilidade celular [16, 100]. Todas estas as alterações têm como finalidade, por um lado permitir a saída dos tecidos para os órgãos linfóides secundários e por outro potencializar a sua capacidade de apresentação de antígenos às células T.

Cada população de DC responde a um espectro único de quimocinas devido à distinta gama de recetores expostos à sua superfície. Por sua vez, estes recetores sofrem alterações durante a transformação de DCs imaturas na periferia a DCs maduras capazes de instruir as células T *naïve*, tal como observado na **Figura 11**. Por outras palavras, no estado imaturo, as DCs expressam elevados níveis dos recetores CCR1, CCR2, CCR3 e CCR5, o que permite a estas células responder prontamente às quimocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, libertadas sobre condições de dano tecidual, infeção ou inflamação [101, 102]. Assim é induzida a maturação das DCs, as quais perdem a sua capacidade de responder a estas quimocinas inflamatórias e regulam crescentemente o **recetor homing do nódulo linfático** CCR7 [103], a partir do qual adquirem a capacidade de resposta a quimocinas linfóides como CCL19 (MIP-3 β) e CCL21 (6Ckine) [110]. As DCs maduras ao entrarem nos gânglios linfáticos migram para a área paracortical em resposta às citocinas MIP-3 β e/ou 6Ckine libertadas por células

presentes na zona T. As DCs recém-chegadas podem tornar-se uma fonte de MIP-3 β e 6Ckine, permitindo a amplificação e/ou persistência do sinal quimiotático [97].

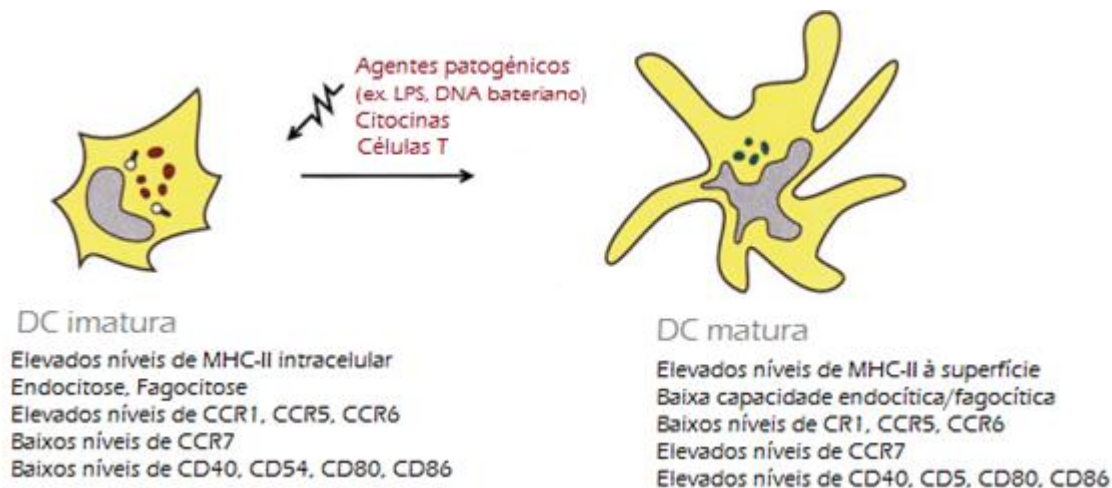


Figura 11 – Características que mudam durante a maturação das DCs. Imagem adaptada de [16].

Na área das células T, é estabelecida a ligação DC-célula T, mediada por diversas moléculas de adesão (CD50, CD54 e CD58), em que o reconhecimento do complexo MHC-peptídeo pelo TCR despoleta a diferenciação dos linfócitos T *naïve* em células memória ou efectoras, que atuam seguidamente na resposta ao antígeno [104]. Tal como é visível na **Figura 12**, as células dendríticas induzem o desenvolvimento de diferentes tipos de linfócitos mediante o tipo de estímulo recebido. Por outras palavras, o tipo de PAMPs reconhecido influencia a atividade funcional das DCs, que se reflete no perfil de citocinas libertadas, traduzindo-se por fim numa resposta imune direcionada a um PAMP específico. É de notar que as células T podem também ativar as células dendríticas mediante a interação CD40-CD40L, sinalização que leva ao aumento da expressão de CD80/86 e libertação de citocinas (IL-1, TNF α , IL-12) [105].

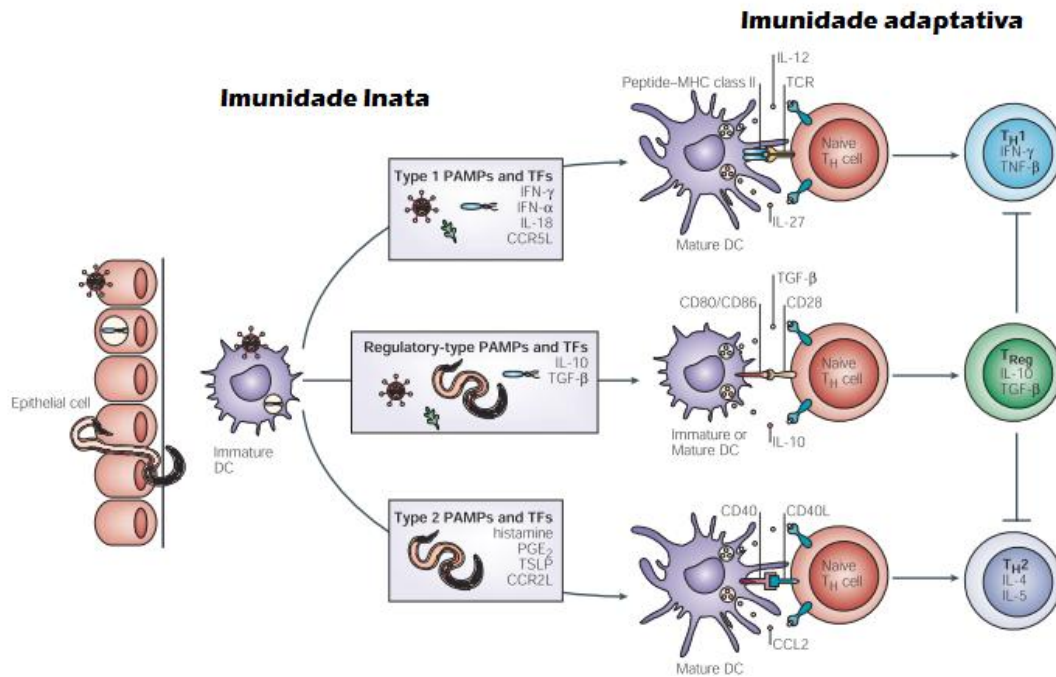


Figura 12 – Influência do tipo de microrganismos, reconhecidos no local de ativação, na polarização das células dendríticas. As células dendríticas imaturas (DCs) podem ser polarizadas por diferentes tipos de PAMPs, definidos como 1, 2 e regulatórios ou fatores tecidulares para se tornarem maduras, promovendo o desenvolvimento das células T *naïve* em Th1, Th2 ou T reguladoras. Uma exceção é que certos agentes patogênicos podem inibir a maturação de DC, resultando em DCs imaturas regulatórias. Imagem adaptada de [106].

Para além do papel na ativação dos linfócitos T, as células dendríticas encontram-se também envolvidas na estimulação dos linfócitos B. Estudos demonstram que mediante a libertação de fatores solúveis específicos como IL-6, IL-10 e TGF- β , as DCs têm a capacidade de induzir a proliferação e produção de anticorpos nas células B [107, 108]. Adicionalmente, encontra-se também demonstrado que as DCs podem interagir diretamente com as células B e induzir a libertação de IgA [109]. Estes resultados sugerem assim o envolvimento das DCs no desenvolvimento de uma resposta imune humoral [97].

Mesmo na ausência de agentes patogênicos, existe uma fração de DCs em movimento. Estas dendríticas *migratórias* medeiam o processo de tolerância dos linfócitos T aos antígenos que são intrínsecos ao corpo (*self-antigens*), desempenhando um importante papel na minimização de reações autoimunes [110]. As células T que expressam recetores com elevada afinidade para peptídeos derivados de proteínas do próprio são eliminados no timo através de um processo de seleção negativa mediado por células dendríticas e células epiteliais medulares do timo. Embora o processo de seleção negativa seja eficiente na prevenção da auto-reatividade, algumas células T reativas

contra o próprio escapam para a periferia, onde são mantidas sob controlo através de vários mecanismos de tolerância periférica (deleção, indução de anergia e supressão via células T reguladoras) [99]. Estudos recentes têm destacado o papel que as DCs periféricas desempenham na indução e manutenção de células T reguladoras, responsáveis pela supressão de uma resposta imune [111]. Verificou-se que a alteração do número de DC, por manipulação genética ou farmacológica, resulta em concomitantes alterações no número de Treg, demonstrando uma relação entre o número de Treg na periferia com o número de DCs presentes nos órgãos linfóides [112]. Estes estudos fornecem a noção de que as DCs que apresentam antígenos do próprio na periferia são responsáveis pela manutenção da homeostase das Treg, considerando-se que um melhor entendimento dos mecanismos moleculares pelo qual a população de DCs periféricas mantém o número de Treg irá ser importante para desenhar terapias futuras para a autoimunidade [99].

As células dendríticas constituem assim uma família de células que apesar de rara é bastante heterogénea e cujos diversos subtipos desempenham diversos papéis que no todo se traduzem no controlo da imunidade e tolerância. Nos próximos capítulos serão assim referenciados os diversos subtipos de DCs existentes no corpo humano, com principal foco nos subtipos presentes no sangue.

A. 2. 2. 3. Células Dendríticas: Os diversos subtipos

Ao longo destes anos, diversos subtipos de DCs, que divergem na sua distribuição anatómica, expressão de marcadores à superfície da célula, padrões de migração e produção de citocinas, têm sido identificados [74]. Apesar da função fisiológica precisa desta população heterogénea ainda estar por compreender, tem-se a ideia clara de que os diversos subtipos de DCs colaboram entre si para atingir a imunidade e tolerância.

Diversas terminologias são empregues para designar os diferentes grupos de DCs. Quando as células dendríticas são designadas de **convencionais** significa que estas células já demonstram a forma de dendrítica e exibem a função de DC no estado estacionário. Por outro lado, quando as DCs são intituladas como **precursoras** considera-se que estas células requerem subsequente desenvolvimento para adquirir a forma e função de DC, correspondendo ao último estadió das DCs [85].

As células dendríticas encontradas no **estado estacionário** tanto em rato como em humano incluem as **células dendríticas plasmacitóides** produtoras de interferão I (pDCs) e as **células dendríticas mielóides**, presentes nos tecidos não linfóides e linfóides, e na circulação. Em situações de inflamação, DCs designadas como

inflamatórias são também detetáveis e correspondem a um grupo de células que não se encontram presentes normalmente no estado estacionário mas aparecem como consequência de um estímulo microbial ou inflamatório, incluindo as DCs 16⁺ (DCs derivadas de monócito) e DCs produtoras de TNF e sintase óxido nítrico [85, 113].

As DCs podem também ser divididas de acordo com a sua localização tecidual, como as **DCs na pele** (inclui as *células de Langerhans (LCs) na epiderme*, *DCs dermais nas derme da pele* e *DCs associadas às mucosas*); as **DCs associadas aos tecidos linfóides** (inclui as *DCs da zona marginal do baço*, *DCs interdigitais associadas à zona das células T (IDCs)*, *DCs do centro germinal*, *DCs foliculares (FDCs)* e *DCs do timo*) e **DCs dos tecidos intersticiais** (intDCs) encontradas em órgãos como fígado, pulmão e coração [79, 88]. Cada tecido possui um microambiente distinto que se deve maioritariamente às células que o compõem e às moléculas expressas pelas mesmas. Deste modo, considera-se que o microambiente de cada tecido tem grande impacto na função de cada DC residente, resultando numa elevada variedade de DCs de acordo com a localização [88].

Devido à acessibilidade do tecido, os subtipos de células dendríticas humanas presentes no sangue periférico encontram-se bem caracterizados na literatura em comparação a outros tecidos. Recorrendo a um conjunto de anticorpos monoclonais dirigidos a moléculas ancoradas à superfície ou em organelos, diferentes tipos de DC tanto em humanos como em ratos têm sido descritos [78]. *MacDonald e colaboradores* mostraram que o sangue humano contém cinco tipos diferentes de DCs enquanto que no rato apenas se observam dois [114]. De acordo com o seu fenótipo, as populações de DCs no sangue humano não apresentam marcadores de linhagem específicos (ex. CD3, CD14, CD19, CD56) mas expressam HLA-DR (MHC classe II) [114]. Esta população pode ser dividida em várias subpopulações, caracterizadas por fenótipos que não se sobrepõem (definida expressão de **CD1c** (BDCA1), **CD141** (BDCA3), **CD123**, e **CD16**) e distintas propriedades funcionais [115]. No sangue é também identificada a população CD34⁺ que corresponde a progenitores hematopoiéticos que circulam entre a medula óssea e o sangue [116], sendo que alguns deles descrevem a capacidade de se diferenciar em DCs [117]. Devido ao reduzido número de células presentes no sangue e falta de marcadores definidos, esta população não tem sido nomeada no âmbito dos diferentes subtipos de DCs presentes no sangue.

A subpopulação CD123⁺ representa a **DC plasmacitóide**, com papel definido durante as infeções virais, e as populações remanescentes compreendem varias subtipos de **DC mielóide** que exibem propriedades clássicas de DC, incluindo fagocitose e

apresentação e processamento antigénico. Dentro das DCs mielóides, destaca-se o subtipo **DC CD16⁺**, definido como proinflamatório, devido à elevada produção de TNF- α , e é designado por alguns autores como DCs derivadas de monócitos (Mo-DCs). Estudos do perfil de expressão genética e dados de *clustering* hierárquico indicaram que as DCs plasmacitóides e DC 16⁺ são originadas de células precursoras distintas, enquanto os subtipos DC mielóides CD1c⁺ e CD141⁺ partilham um progenitor comum e representam dois diferentes estádios do mesmo subtipo [118].

A. 2. 2. 3. 1. Célula dendrítica mielóide

A população de DC mielóide partilha entre si diversos marcadores que tal como o próprio nome indica, sugerem a sua derivação da linhagem mielóide merecendo especial destaque as glicoproteínas transmembranares CD13 e CD33 [61]. Definidas na literatura como células Lin⁻CD11c⁺HLA-DR⁺, análises à frequência relativa e níveis de expressão de HLA-DR e CD11c, combinado com os marcadores CD1c (BDCA1) e CD141 (BDCA3) tornaram possível a distinção dos diferentes subtipos [61, 114], excluindo nesta distribuição as células dendríticas que expressam CD16. De acordo com o **antigénio das células dendríticas do sangue** (*Blood DC Antigen* – BDCA) expresso na sua superfície, verificou-se que estas células promoviam a regeneração de populações de DCs residentes em diferentes locais do organismo [119]. As células marcadas com a glicoproteína associada à β_2 -microglobulina, classificada com BDCA1, demonstravam ser uma população que expressava elevados níveis de CD11c e HLA-DR, presente no sangue periférico sob uma percentagem de 9 – 24% do total de DCs [114]. As células que expressavam a trombomodulina, classificadas como BDCA3, expressão CD11c e HLA-DR de forma moderada a forte, correspondendo a uma população menos representada no sangue (1 – 6% do total de DCs) [61]. Na literatura considera-se que o subtipo BDCA1 corresponde a um precursor direto das células de Langerhans [120] ao contrário das células BDCA3 que originam células dendríticas dos tecidos intersticiais (intDCs) e células dendríticas da derme [83]. Apesar das distintas localizações anatómicas, os dois subtipos de DC mielóides convencionais gozam das funções tipicamente atribuídas às DCs nomeadamente no que diz respeito à capacidade de captação antigénica e estimulação dos linfócitos T. Estudos comparativos realizados nos últimos anos relatam diferenças na expressão de determinadas moléculas particularmente recetores e citocinas que influenciam o papel destas células na imunidade [121]. As células BDCA1 são definidas pela capacidade de produzir níveis elevados de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α e assim envolvidas na ativação de linfócitos Th2 e

Th17. Contrariamente, as células BDCA3⁺ são as definidas como as maiores produtoras de IFN- β , consequência da expressão mais intensa do recetor TLR3, e encontram-se assim envolvidas na indução de resposta por parte dos linfócitos T citotóxicos [122] e de linfócitos Th1[121]. Este estudo demonstrou também diferenças na expressão de TLRs, os quais desempenham um importante papel no reconhecimento de PAMPs. As células BDCA3 expressam os recetores TLR 1, 2, 3, 6, e 10, ao contrário das células BDCA1 que expressam os recetores TLR 3, 4, 5 e 7.

A. 2. 2. 3. 2. Célula dendrítica CD16⁺

As células dendríticas CD16⁺ são conhecidas pela resposta ativa a estímulos inflamatórios e microbianos e pela elevada eficácia na captura de antígenos e estimulação das células T [123]. Contudo, a existência de células dendríticas que derivem de monócitos subsiste ainda nos dias de hoje um assunto bastante controverso [87].

Estudos pioneiros dirigidos por *Sallusto e colaboradores*[124] e mais tarde por *Bender e colaboradores*[125], onde foram cultivadas células da medula óssea do rato ou monócitos isolados do sangue humano com o **fator estimulador de colónia granulócito e macrófago** e IL-4, verificaram que os monócitos originavam células dendríticas que expressavam elevados níveis de CD11c e MHC classe-II e atuavam como potentes células apresentadoras de antígenos. A ideia de que os monócitos poderiam ser precursores diretos de DCs *in vivo* foi suportada mais tarde pelas experiências com monócitos CD14⁺ humanos realizadas por *Randolph e colaboradores* [126]. Constatou-se que os monócitos que entravam nos vasos linfáticos a partir dos tecidos perdiam a capacidade de expressar os marcadores CD14 e CD64 e aumentavam a expressão das moléculas HLA-DR e CD54. A posterior incorporação de partículas fagocíticas estimulava a expressão de CD80, CD86, HLA-DR, DC-LAMP e CD83, todas elas moléculas expressas por DCs. Consistentes com estas alterações na sua superfície celular, os monócitos ativados estimulavam a proliferação de células T alogénicas numa mistura de reações linfocitárias mistas. Contudo, nenhum destes marcadores de superfície é unicamente expresso por DCs ou define a sua linhagem, e todas as células que expressam níveis suficientemente elevados de HLA-DR e moléculas co-estimuladoras podem estimular *in vitro* as reações linfocitárias mistas [127, 128], permanecendo a questão da verdadeira identidade destas células ainda por responder. Mais tarde outros estudos comprovaram que os monócitos são incapazes de produzir DCs clássicas em estado estacionário [129, 130], concluindo assim que os monócitos podem apenas

desenvolver algumas características de DCs sob condições de inflamação *in vivo* ou quando cultivadas com citocinas *in vitro*.

Contrapondo todos estes estudos, a existência deste subtipo de DC 16⁺ no cordão umbilical [131] e no sangue de indivíduos saudáveis (31-58% do total de DCs) [114], sugere a existência de outro progenitor, existindo atualmente o debate se estas células derivam de uma linha monocítica ou de células dendríticas [132].

Nos últimos anos *Cheong e colaboradores* [133] demonstraram que em resposta a injeções de LPS ou a bactérias gram-negativas, os monócitos de rato migravam para os gânglios linfáticos. Estes rapidamente adquiriam as propriedades chave das células dendríticas designadamente a típica morfologia estrelada e a capacidade de apresentar antígenos exógenos às células T CD4⁺ e CD8⁺, sugerindo que as DCs CD16⁺ possuem um papel preponderante no começo da imunidade adaptativa dirigida a bactérias gram-negativas. Ao contrário do que se considerava, verificou-se, também, que os monócitos que originavam estas DCs migravam diretamente para os gânglios linfáticos através das vénulas endoteliais, mediante a expressão da molécula de adesão CD62L e do recetor de quimocina CCR7, não entrando primeiramente nos tecidos não linfóides inflamados.

No sangue periférico, estudos de caracterização fenotípica e funcional direcionados a esta população enigmática, identificada pela diminuta ou nula expressão de CD14 em conjunto com a elevada expressão do recetor FcγR-III (CD16) e do marcador mielóide CD33, constataram que as DC CD16⁺ produziam elevados níveis de citocinas pro-inflamatórias após exposição a LPS, nomeadamente IL-6 e TNF-α, e que ao contrário dos monócitos expressavam à superfície o TLR3 [131].

A. 2. 2. 3. 3. Célula dendrítica plasmacitóide

Caraterizadas inequivocamente apenas em 1999 [134, 135], as células dendríticas plasmacitóides (pDCs) correspondem a uma rara população de células especializadas na rápida e massiva secreção de **interferão do tipo I** (IFN) em resposta a ácidos nucleicos estranhos [136]. Para tal, dispõem de adaptações moleculares únicas que lhes permitem iniciar uma resposta imune pela ativação de DCs clássicas, linfócitos T, NK e células B [136, 137]. Em indivíduos saudáveis, as pDCs equivalem apenas a 7-38% do total de células dendríticas presentes no sangue periférico [114]. Após o seu desenvolvimento na medula óssea sobretudo a partir de uma linhagem linfóide [138], migram diretamente para as áreas ricas em linfócitos T dos órgãos linfóides onde normalmente residem [139]. Ao contrário dos outros subtipos de DCs, em condições normais as pDCs são difíceis de detetar na maioria dos tecidos periféricos [140]. Contudo, um elevado número de pDCs

tem sido descrito nos tecidos em condições de inflamação e autoimunidade [137]. Considera-se atualmente que estas células têm a capacidade de migrar livremente ao longo do organismo, independentemente da existência de um estímulo inflamatório [141].

Tal como o próprio nome indica, as pDCs são células redondas com um retículo endoplasmático rugoso proeminente que se assemelham com os plasmócitos [137, 142]. Para além da sua morfologia, as células dendríticas plasmacitóides distinguem-se das células dendríticas mielóides pelos marcadores expressos à superfície, na localização tecidual, secreção de citocinas e função na apresentação antigénica [143]. Quando isoladas pela primeira vez do sangue humano como células CD4⁺CD123⁺ (cadeia α do recetor da IL-3) verificou-se que as pDCs não apresentavam marcadores de linhagem para células B, células T, células mielóides (CD13, CD14 e CD33) e células NK assim como a molécula CD11c presente em todas as outras DCs [144, 145]. Mais recentemente, um considerável número de marcadores específicos para pDC foram identificados e deste modo facilitaram todo o processo de isolamento deste subtipo de células dendríticas. Entre estes evidencia-se o **antigénio de DC do sangue - 2** (BDCA-2) uma glicoproteína transmembranar da família de lectina tipo-C que é exclusivamente expressa por pDCs [146]. Outros recetores específicos para as pDCs incluem o **transcrito semelhante a imunoglobulina -7** (*immunoglobulin-like transcript 7* - ILT7) ou CD85g, membro da família de **recetores leucocitários semelhantes a imunoglobulina** (Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor - LILR) [147]; e BDCA-4 ou CD304, recetor da família semaforina [148].

A habilidade singular das pDCs em responder com quantidades robustas de IFN do tipo I a ácidos nucleicos endossomais está associada com a expressão de recetores do tipo *toll* específicos, nomeadamente TLR7 e TLR9 [149]. Com 6 horas de ativação, as pDCs humanas dedicam 60% do transcrito induzido aos genes IFN do tipo I, produzindo 200 a 1000 vezes mais IFN do tipo I que qualquer outra célula do sangue [134]. Estas moléculas são responsáveis pela indução da resposta antiviral e por acautelar a propagação da infeção viral como também pelo iniciar de eventos moleculares e celulares que são cruciais para a construção de uma resposta imune protetora contra vírus [150]. Concretamente, o IFN tipo I ativa fortemente as DCs imaturas, levando-as a produzir IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23, citocinas que não são produzidas pelas pDCs [151], e aumentam também a capacidade das mDC apresentarem por apresentação cruzada antígenos aos linfócitos T CD8⁺, promovendo a sobrevivência e expansão clonal destas células [152, 153], e polarização das células T CD4⁺ em Th1[154, 155]. O IFN do tipo I tem também a capacidade de induzir a

diferenciação de monócitos em DCs [156], estimula a ativação das células NK [157] e diferenciação de células B em plasmócitos [158]. É de salientar que estas células apresentam também importantes funções na imunidade aquando num estado inativo ou imaturo. Diversos estudos demonstram o papel especializado das pDCs inativas na tolerância periférica, nomeadamente na indução de anergia específica para um antígeno, suprimindo a proliferação de células T específicas a um antígeno [159].

Relativamente à captura e apresentação antigénica, as pDCs descrevem algumas diferenças quando comparadas com outros subtipos de DCs presentes no sangue. Diversos estudos demonstram que as pDCs apresentam eficientemente antígenos endógenos, tanto expressos constitutivamente como derivados de pDCs infetadas por vírus [160]. Contudo, quando comparados com DCs convencionais, as mesmas descrevem uma apresentação de antígenos exógenos fraca. Uma razão para isto é que as pDCs são incapazes de capturar antígenos exógenos por fagocitose ou macropinocitose [161]. Outro fator que impede a pDC de apresentar antígenos exógenos tão eficientemente quanto as DCs convencionais é a incapacidade destas acumularem complexos MHC-peptídeo na sua superfície celular. Isto deve-se ao facto do **fator principal de transcrição da maquinaria de MHC classe II (CIITA)** não ser silenciado em pDCs ativadas, que assim sintetizam continuamente moléculas de MHC classe II após ativação [162, 163]. Contudo, as pDCs falham nos processos subsequentes necessários para a acumulação destes complexos na superfície, nomeadamente na diminuição da ubiquinação de MHC classe II e expressam níveis baixos de HLA-DR e moléculas co-estimulatórias [136].

Deste modo, tanto os monócitos como as células dendríticas correspondem a elementos do sistema imune fulcrais no início e condução de uma resposta específica direcionada a um elemento estranho. Em situações de autoimunidade, quando antígenos do nosso próprio organismo são identificados como estranhos, o estudo desta família de células torna-se preponderante para a compreensão do problema. No próximo capítulo será focado o papel de monócitos e células dendríticas na progressão da resposta autoimune, nomeadamente na Esclerose Sistémica.

B. Autoimunidade e doenças autoimunes

Define-se como **autoimunidade** toda a resposta imune adquirida direcionada a antígenos do próprio organismo [164]. As **doenças autoimunes** são doenças inflamatórias crónicas de etiologia desconhecida que resultam da combinação de uma suscetibilidade genética, fatores ambientais e desregulação imune [165]. Existem

aproximadamente 70 doenças humanas classificadas como autoimunes que diferem em termos de tecido alvo, idade afetada e resposta a tratamentos imunossupressivos [166].

Tal como referido anteriormente, no timo ocorre um processo de seleção, mediado por células dendríticas, que se traduz na eliminação de linfócitos T que demonstrem reatividade a antígenos do próprio organismo. A partir do momento em que este processo de tolerância central não é absoluto, células T reativas ao próprio podem ser encontradas na periferia mesmo em indivíduos saudáveis. Contudo, o desenvolvimento de uma doença autoimune é normalmente evitado pelos distintos mecanismos de segurança existentes na periferia que protegem o hospedeiro destas células T potencialmente patogénicas [99]. Infecções ou excesso de estimulação das APCs podem quebrar a tolerância periférica e induzir o *priming* das células T autoreativas nos gânglios linfáticos, que leva ao desenvolvimento de doenças autoimunes em hospedeiro predispostos [164]. Defeitos na ativação de linfócitos e mecanismos da imunidade inata, produção massiva de citocinas e secreção de autoanticorpos, são características comuns das diferentes doenças autoimunes. De entre estes, um elevado número de anticorpos no soro direcionados a estruturas funcionais das células (ácidos nucleicos, moléculas nucleares, recetores, ou outros componentes funcionais) é tida como uma impressão digital deste tipo de patologia e a sua presença desempenha um importante papel no diagnóstico e classificação dos diferentes tipos de doenças autoimunes [166].

No âmbito deste trabalho será focada uma doença autoimune em particular, a **Esclerose Sistémica**.

B. 1. Esclerose Sistémica

A **Esclerose Sistémica** (*Systemic Sclerosis* - SSc) é uma doença crónica rara do tecido conjuntivo caracterizada por dano vascular, autoimunidade e deposição excessiva de colagénio [167]. O nome *esclerose* provém do grego *skleros* (*hard* em inglês) e reflete o *endurecimento* da pele e órgãos viscerais presenciado nesta patologia, consequente da produção exagerada de proteínas da matriz extracelular mediada primariamente por fibroblastos e miofibroblastos. Embora seja uma doença reumática pouco comum, é das que detêm a maior taxa de mortalidade e afeta principalmente mulheres [167, 168].

A presença de autoanticorpos antinucleares no soro é uma das principais manifestações desta patologia e, dependendo da extensão do envolvimento cutâneo, a SSc pode ser classificada como **limitada** (lSSc) ou **difusa** (dSSc). Considera-se que a SSc é limitada quando o doente apresenta somente alterações teciduais na zona facial, pescoço e nas áreas distais até aos cotovelos ou joelhos. A SSc difusa é um tipo de

esclerose mais grave que envolve a zona do tronco e a zona próxima aos joelhos ou cotovelos [167, 169, 170]. Em ambos os subtipos a zona da pele afetada encontra-se normalmente sobre um prurido intenso e ocorre a perda da morfologia da pele, que se reflete em alterações dos padrões de transpiração e crescimento do pêlo [169]. O fenómeno de *Raynaud* é igualmente um sintoma presenciado em quase todos os indivíduos com SSc e corresponde a um fenómeno vascular que atinge habitualmente as mãos e os pés, em que os tecidos entram em isquémia e traduz-se clinicamente por alterações da coloração da pele. Observa-se também em ambos os tipos o envolvimento de diversos órgãos internos, nomeadamente trato gastrointestinal, rins, coração e pulmões [167, 168]. O pulmão é normalmente o órgão mais afetado, no qual a **fibrose pulmonar** (*Pulmonar Fibrosis* - PF) e a **Hipertensão Arterial Pulmonar** (*Pulmonary Arterial Hypertension* - PAH) são as principais disfunções observadas em doentes com SSc, juntamente com **Crise Renal Esclerodérmia** (*Scleroderma Renal Crisis* - SRC) e **Úlceras Digitais** (*Digital Ulcers* – DU). É importante salientar que apesar do subtipo difuso estar associado a um prognóstico pior, ambos os subtipos apresentam taxas de mortalidade elevadas [167].

B. 1. 1. Esclerose Sistémica: Principais fatores envolvidos

Atualmente é aceite na literatura que o início da Esclerose Sistémica deriva da conjugação de um ou mais fatores ambientais com uma predisposição genética [170]. A exposição a um determinado agente patogénico é considerada como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de doenças autoimunes incluindo a SSc. Esta hipótese é baseada nas observações de que a produção de autoanticorpos específicos na SSc pode dever-se a uma resposta inicialmente dirigida a proteínas desconhecidas de origem viral ou bacteriana mas que devido à sua semelhança estrutural partilhada com moléculas presentes nas células do hospedeiro, **mímica molecular**, origina uma reação autoimune. Entre os diversos agentes referidos na literatura, *parvovírus B19 humano*, *citomegalovírus humano* e a *Helicobacter pylori* são os mais citados no âmbito da SSc. O parvovírus B19 humano é proposto como um agente envolvido em diversas doenças reumáticas e síndromes causadores de dano vascular [171]. Marcadores específicos para este vírus têm sido detetados no soro e em biópsias da medula óssea de doentes com SSc, considerando-se que a medula óssea pode representar um reservatório a partir do qual este vírus migra para os tecidos com esclerose [172]. As infeções causadas pelo citomegalovírus humano desempenham também um importante papel na patogénese da SSc devido à sua capacidade de infetar células endoteliais e monócitos/macrófagos

[171]. Diversos estudos demonstram que um número significativo de doentes com SSc apresentava imunoglobulinas com afinidade para proteínas típicas do HCMV, como UL94, as quais eram responsáveis também por induzir apoptose de células endoteliais humanas [173]. Por sua vez, verificou-se que os anticorpos anti-topoisomerases, caracteristicamente presentes no subtipo difuso da SSc, podiam reagir com as proteínas UL70 presentes neste vírus, justificando-se assim o envolvimento deste vírus na SSc [174]. Por último, a presença de infecções persistentes causadas por *Helicobacter pylori* envolvidas no distúrbio da motilidade gastrointestinal parece estar associado ao fenómeno de Raynaud em doentes com SSc [175]. A exposição a determinadas substâncias, como solventes orgânicos e sílica cristalina, têm sido referidas igualmente como possíveis causas da SSc [168].

O facto de os índios *Choctaw* de *Oklahoma* representarem uma das populações com maior taxa de prevalência de SSc no mundo e com os diferentes padrões de expressão de MHC quando comparados com outros grupos étnicos, sugere a contribuição dos fatores genéticos no desenvolvimento e expressão de SSc [170]. Contudo, um estudo realizado em gémeos (amostra de 24 monozigóticos e 18 dizigóticos) demonstrou a baixa concordância no aparecimento da patologia (4.7%), sugerindo que o componente hereditário não é por si só suficiente para originar SSc [176]. Estudos publicados recentemente identificam alguns polimorfismos como potenciais candidatos subjacentes ao aparecimento da SSc, salientando o gene para o *fator de crescimento Transformante β* (TGF β 1) e fibrilina-1 [177].

B. 1. 2. Esclerose Sistémica: Fisiopatologia

A fisiopatologia da Esclerose Sistémica é complexa e os detalhes precisos subjacentes à sua causa e progressão permanecem ainda desconhecidos. Atualmente considera-se que patologia envolve pelo menos três processos: dano vascular, ativação do sistema imunitário e fibrose visceral e cutânea [167, 168], representados na **Figura 13**.

O dano vascular ou **vasculopatia** é considerada como a primeira manifestação clínica da patologia e precede o processo fibrótico em meses ou anos [168]. A vasculopatia é possivelmente desencadeada por um conjunto indefinido de agentes (agentes patogénios, anticorpos direcionados a células endoteliais, toxinas, citocinas inflamatórias, entre outros) e traduz-se numa debilidade vascular derivada de processos inapropriados de reparação [178].

A ativação da apoptose nas células endoteliais é considerada como o primeiro evento, e caso estas células não sejam repostas devidamente, manifestações clínicas típicas da vasculopatia podem ocorrer [179]. Neste caso, as células endoteliais ativadas tendem a aumentar a expressão de fatores pro-inflamatórios, vasoconstritores, trombogénicos e mitogénicos em detrimento da expressão de fatores vasodilatadores, anti-trombogénicos e anti-mitogénicos que originam a constrição dos vasos sanguíneos, inflamação, recrutamento de plaquetas para o local do dano e proliferação intimal e adventicial com consequente perda da elasticidade dos vasos sanguíneos e aumento do estreitamento luminal [178, 179]. A vasoconstrição, que neste caso se reflete como exagerada, tem como consequência episódios vasoespásticos frequentes, responsáveis pelo bloqueio do fluxo sanguíneo e consequente hipoxia tecidual, maioritariamente observados nas extremidades do corpo como os dedos. Este processo é identificado em doentes com SSc como fenómeno de *Raynaud* e, enquanto este deriva da vasoconstrição reversível dos vasos, as DU são consequentes da isquemia irreversível com consequente perda de tecido, observada em ≈30% dos doentes [180]. A vasoconstrição dos vasos sanguíneos que envolvem os pulmões tem como consequência o aumento anormal da pressão sanguínea e deste modo o desenvolvimento de PAH [168]. Considera-se que os mecanismos subjacentes a DU e PAH são os mesmos.

No estadio inicial da Esclerose Sistémica, o aumento da permeabilidade vascular e o aumento da expressão de **moléculas de adesão** como **VCAM-1** e **ICAM-1**, e **mediadores vasoativos**, mediado pelas células endoteliais, origina edema vascular observado em doentes recém-diagnosticados [167].

A remodelação dos vasos danificados, por processos de **vasculogénese** ou **angiogénese**, denota-se fulcral para a restabelecimento da homeostasia, contudo em doentes com SSc, todos estes processos de restauração vascular encontram-se comprometidos. O aumento aberrante de fatores angiogénicos como **Fator de Crescimento derivado das plaquetas** (PDGF), **Fator de Crescimento do Endotélio Vascular** (VEGF), **Endotelina-1**, **TGF-β** e **CCL2** é apontado como o principal responsável [181]. Para além do comprometimento da reparação vascular, estudos revelam que a libertação destas moléculas encontra-se associada ao desenvolvimento da fibrose. A Endotelina-1 é uma molécula vasoconstritora que se encontra em elevados níveis no sangue e fluido broncoalveolar de doentes com SSc e, para além de causar hipoxia vascular e dano endotelial, promove a adesão de leucócitos ao endotélio, ativação de fibroblastos e migração vascular de células do músculo liso para a intima, seguido de proliferação [182]. Todos estes processos culminam no aumento da **síntese**

de moléculas da matriz extracelular – Fibrose, e hipertrofia dos vasos sanguíneos [178].

A **fibrose** é a característica que distingue a SSc de outras doenças autoimunes e traduz-se na deposição excessiva de colagénio e de outros componentes da matriz extracelular, como proteoglicanos, fibronectina e elastina, nos órgãos internos e na pele. A fibrose observada em alguns órgãos internos como os pulmões é a principal responsável pela elevada taxa de mortalidade associada a esta patologia [168].

Os fibroblastos são considerados os intervenientes chave na promoção da remodelação da matriz extracelular e, em doentes com SS, são tipicamente caracterizados pela ativação exagerada e prolongada [178]. Neste caso, a excessiva produção de fibras de colagénio hialinizado em combinação com a diminuta clivagem dos componentes da matriz extracelular origina a deposição crónica de matriz extracelular nos tecidos. Por outro lado, a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, igualmente especializados na síntese de colagénio e outros componentes da matriz extracelular, pode ocorrer. Estes por sua vez desempenham um papel essencial na fibrose pelo facto de serem uma das principais fontes de TGF- β , mediador direto da fibrose e indutor da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos [178]. Uma das questões centrais na fisiopatologia da Esclerose Sistémica é o que mantém os fibroblastos persistentemente ativos. Estudos revelam que os fibroblastos são recrutados e ativados por diversas citocinas, quimocinas e fatores de crescimento como IL-1, TGF- β , PDGF e CCL2 [183], e que a resistência a sinais inibitórios emitidos pelo contacto com as células T está envolvida neste processo [167]. Outros estudos têm sugerido que para além da elevada estimulação destas células, os fibroblastos são resistentes à apoptose mediada por Fas [184].

Por último, a **desregulação autoimune** é também um dos processos típicos da SSc e inclui a ativação de diferentes tipos de linfócitos, que originam a produção de autoanticorpos, libertação aberrante de citocinas e quimocinas e desregulação do sistema imune inato [168].

A hipergamaglobulinemia observada nesta patologia deriva da persistente ativação dos linfócitos B, que após diferenciação em plasmócitos produzem e libertam um conjunto singular de autoanticorpos [185]. Em doentes com SSc, existem três subclasses de autoanticorpos específicos que se encontram associados ao subtipo de esclerose e com o prognóstico da patologia: **anticorpo anti-centrómero**; **anticorpo anti-topoisomerase** (ou anti-Scl70); **anticorpo anti-RNA polimerase III**. O anticorpo anti-centrómero é observado em aproximadamente 60% dos doentes com o subtipo limitado e

confere um maior risco de desenvolver PAH. Em contraste, o anticorpo anti-topoisomerase é observado em aproximadamente 35% dos doentes com o subtipo difuso e encontra-se associado a um pior prognóstico, com aumentado risco de PF. Por último, o anticorpo anti-RNA polimerase III é também encontrado em aproximadamente 20% dos doentes com o subtipo difuso e estão associados com maior risco em desenvolver SRC [169]. É importante referir que não se sabe se os autoanticorpos são os responsáveis pelo dano vascular observado na SSc ou se são consequência do mesmo [178]. Considera-se que as células do sistema imune estão ativadas no estadio inicial da doença, uma vez que infiltrados de células mononucleares aparecem na pele antes do aparecimento de alguma evidência histológica de fibrose cutânea [185].

Os linfócitos T são também ativados em resposta ao dano epitelial e diferenciam-se em diversos subtipos, incluindo Th1, Th2 e Th17. Estes estão associados à libertação de citocinas pro-fibróticas que induzem a fibrose e aumento da regulação de moléculas de adesão nas células endoteliais [167]. Para que se proceda à ativação e manutenção desta resposta imune adaptativa, é necessário que células com capacidade de apresentação antigénica intervenham. Neste contexto será abordado no próximo capítulo o conhecimento atual do papel das células dendríticas e monócitos e respetivas moléculas associadas no desenvolvimento e progressão da Esclerose Sistémica.

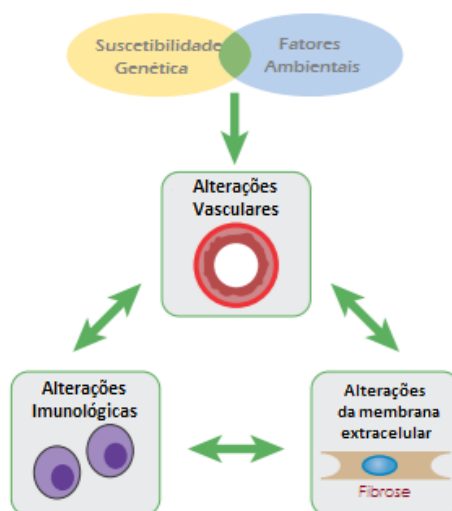


Figura 13 – Resumo esquemático da fisiopatologia da Esclerose Sistémica (SSc). A fisiopatologia da SSc pode envolver uma predisposição genética juntamente com algum fator ambiental desconhecido. Uma vez iniciada, os sucessivos fatores na fisiopatologia da SSc envolve alterações na via vascular, imunológica e fibrótica. Imagem adaptada de [168].

B. 1. 2. 1. Esclerose Sistêmica: Envolvimento de monócitos na autoimunidade

Tal como referido anteriormente, os monócitos são células versáteis que têm a capacidade de iniciar e regular o processo inflamatório e induzir a resposta imune. São também precursores ativos dos macrófagos nos tecidos, os quais são especializados na fagocitose e consequente apresentação antigénica. Alterações no fenótipo e função dos monócitos têm sido associadas a diversas doenças autoimunes, como **Lúpus Eritematoso Sistémico** (*Systemic Lupus Erythematosus* - SLE) [186] e Diabetes Mellitus tipo 1 [187, 188]. Neste caso, observou-se que os monócitos expressavam de forma aberrante marcadores de superfície e produziam elevados níveis de citocinas e quimocinas, que no seu conjunto contribuíam para a patogenia de ambas as doenças. No âmbito da SLE, foi demonstrado que a elevada expressão de moléculas de adesão originava uma migração aberrante e ativação dos linfócitos T por parte dos monócitos, que neste caso atuavam na apresentação de autoantígenos [189]. O aumento de interleucinas, como a IL-6, necessária para a diferenciação das células B em plasmócitos; e IL-10, associada a funções proinflamatórias; e de quimocinas como CCL2 e CXCL10 (IP-10) encontra-se descrito no soro de doentes com SLE [195]. O estudo da disfunção dos monócitos no SLE encontra-se resumido na **Figura 14**. Aumento da frequência de monócitos no sangue e no local da lesão, com consequente aumento de macrófagos, tem sido observado em diversas doenças autoimunes, incluindo Esclerose Múltipla [190], SLE [191] e Síndrome de *Sjögren* [192].

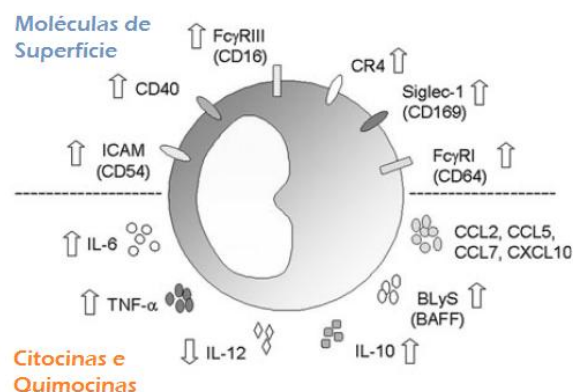


Figura 14 – Expressão anormal de marcadores de superfície e citocinas/quimocinas na SLE. Imagem adaptada de [193].

No âmbito da Esclerose Sistêmica, a caracterização funcional e fenotípica dos monócitos é ainda pobre, contudo considera-se que desempenham um importante papel na interação entre células endoteliais e fibroblastos mediante a produção de fatores inflamatórios. Atualmente sabe-se que os monócitos CD14⁺ circulam

no sangue de doentes com SSc em níveis substancialmente mais elevados, comparado com controlos saudáveis [194]. Considera-se que os níveis elevados de IL-10 e IFN- α no soro de doentes com SSc são responsáveis por este aumento e deste modo há um consequente aumento de macrófagos nos tecidos lesados. Outros estudos demonstram que os monócitos encontram-se ativados na SSc devido à presença de determinadas citocinas, nomeadamente IFN tipo I e IL-13 [195]. Verificou-se também que os níveis elevados de IL-13 encontravam-se associados a doentes com o subtipo limitado e com PAH e que conduzia à estimulação os monócitos e macrófagos [196].

Nos últimos anos, grande parte dos estudos publicados focam-se na associação da expressão das quimocinas CCL2 e CCL7, que pertencem a uma classe de citocinas proinflamatórias produzidas em diversas células como monócitos e fibroblastos; à patogénese da SSc [197, 198]. Tal como o próprio nome indica, estas quimocinas encontram-se envolvidas no recrutamento de monócitos e alguns estudos demonstram que a CCL2 encontra-se elevada tanto na pele como no soro de doentes com SSc. Esta desempenha um papel chave na infiltração de células mononucleares e desenvolvimento de infiltrados inflamatórios nos estádios iniciais da SSc, com consequente estimulação dos fibroblastos. A CCL7 encontra-se também elevada na SSc e ativa a produção de colagénio pelos fibroblastos [199].

Deste modo, encontra-se claro na literatura que, na Esclerose Sistémica, os monócitos são recrutados de modo crónico para os tecidos lesados. Contudo, os níveis de cada subtipo de monócito no sangue assim como os perfis de expressão de moléculas de adesão e citocinas/quimocinas permanecem pouco elusivos, encontrando-se por esclarecer qual a função dos monócitos neste ambiente autoimune.

B. 1. 2. 2. Esclerose Sistémica: Envolvimento das células dendríticas na autoimunidade

O papel nas células dendríticas nas doenças autoimunes é visto como um paradoxo uma vez que para além de serem apontadas como um dos principais intervenientes na indução da reação autoimune, são atualmente vistas como possíveis alvos de tratamento [79]. Diversos estudos têm mostrado a existência de alterações na migração e acumulação de células dendríticas em lesões ativas de diferentes doenças autoimunes, como Psoríase, Gastrite Autoimune, Diabetes tipo 1, Síndrome de Sjögren, entre outras, e a correlação da sua atividade com a progressão deste tipo de doença [200]. Estudos distintos realizados a doentes com Síndrome de *Sjögren* e SLE demonstram que os níveis de células dendríticas, maioritariamente o subtipo de DCs plasmacitóide e mielóide CD11c⁺, encontram-se diminuídos no sangue e que tal se reflete na sua presença em

lesões inflamatórias das respetivas doenças [201, 202]. Por outro lado, estudos dirigidos a doentes com Esclerose Múltipla demonstram que para além da elevada frequência das DCs nos locais de lesão, estas células expressavam elevados níveis de moléculas envolvidas no estímulo dos linfócitos T, como HLA-DR, CD80, CD86 e CD40 [203, 204]. Considera-se assim que algumas doenças autoimunes, como Esclerose Múltipla e SLE, estão associadas à apresentação anormal de antígenos do próprio por parte das células dendríticas, com consequente ativação de linfócitos T autoreativos. Por outro lado, a produção descontrolada de citocinas por diversos subtipos de DCs ou defeito na indução e manutenção da tolerância a um antígeno específico estão na base da origem da autoimunidade [79, 205]. Estudos direcionados às células dendríticas plasmacitóides, em diversas doenças autoimunes, Lúpus Eritematoso Sistémico e Psoríase, demonstram que estas células expressam níveis crónicos de IFN do tipo I, responsável pela mobilização de granulócitos e monócitos para o local do dano [206, 207]. Por outro lado, a libertação de citocinas como IL-6 e IL-23 pelas DCs mielóides encontra-se associada à diferenciação dos linfócitos T *naïve* em linfócito Thelper 17, os quais desempenham importante papel na amplificação da resposta autoimune e progressão da inflamação crónica a ela associada [208].

Em situações normais, as células dendríticas estão envolvidas na remoção de corpos apoptóticos e, após a ingestão deste conteúdo, induzem a tolerância das células T. Contudo foi mostrado que com a idade, as células dendríticas possuem a capacidade de fagocitose comprometida, verificando-se que as DCs de uma população de idosos (65-90 anos), demonstravam maior reatividade a antígenos do próprio e um aumento de produção de citocinas próinflamatórias como a IL-6 e o IFN- α [209]. Considera-se assim que o envelhecimento pode também contribuir para um declínio da tolerância aos antígenos do próprio e potenciar o aparecimento de doenças autoimunes.

No caso particular da Esclerose Sistémica, a caracterização funcional deste tipo de células encontra-se pouco estudada. Atualmente, os estudos publicados são escassos na caracterização do perfil de moléculas sinalizadoras produzidas por células dendríticas, estando descrito apenas o aumento de IL-6 e TNF- α em doentes que se encontravam no estadio inicial da patologia, e elevados níveis de IL-10 em doentes portadores do subtipo difuso [210]. Contudo, no estudo citado, os níveis de citocinas foram medidos no soro dos doentes, não fornecendo indicações de qual a célula maioritariamente responsável pela sua produção. Outro estudo mediu os níveis de IFN- α no soro de doentes com SSc e demonstrou que, tal como noutras doenças autoimunes, a via de IFN- α encontrava-se ativa e contribuía para a vasculopatia e fibrose pulmonar [211]. Este estudo demonstrou

igualmente que os níveis de CXCL10 encontravam-se elevados no soro destes doentes e que o mesmo está associado a hipertensão pulmonar arterial e envolvimento cardíaco. Foram também publicados estudos relativos a polimorfismo nos genes de TLR nas DCs e respetiva associação à Esclerose Sistémica, verificando-se que um polimorfismo no TLR2 está ligado ao desenvolvimento do subtipo difusa da doença e de PAH [212].

II. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi contribuir para o melhor conhecimento da fisiopatologia da SSc, nomeadamente através do estudo das diferentes subpopulações de monócitos e de células dendríticas no sangue periférico de doentes com SSc.

Para alcançar este objetivo, mediante a utilização da técnica de citometria de fluxo, foram realizadas as seguintes tarefas:

i) Quantificar em percentagem e valor absoluto as diferentes subpopulações de monócitos (monócito CD14⁺CD16⁺ e monócito CD14⁺CD16⁻) e células dendríticas (DC mielóide, DC plasmacitóide, DC CD16⁺) no sangue periférico de doentes com SSc e na população controlo.

ii) Quantificar a frequência de monócito CD14⁺, DC mielóide e DC CD16⁺, produtores da citocina IL-6 e quimocinas IL-8, CXCL10 e CCL4 bem como a frequência destas moléculas por célula no sangue periférico de doentes com SSc e na população controlo.

iii) Avaliar a expressão de ICAM-1 nas diferentes subpopulações de células em estudo no sangue periférico de doentes com SSc e na população controlo.

III. MATERIAL & MÉTODOS

A. Caracterização da população em estudo

Seguidos no departamento de Reumatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, quarenta e três (43) doentes com Esclerose Sistémica, dos quais 34 eram mulheres e 9 eram homens, com a idade média de $57,3 \pm 12,6$ anos e $54,7 \pm 11,7$ anos respetivamente, foram incluídos no estudo. Todos os doentes cumprem o critério preliminar da Sociedade Americana de Reumatologia [213] e foram agrupados no subtipo limitado (ISSc, n=30) ou subtipo difuso (dSSc, n=13), baseado no sistema de classificação proposto inicialmente por *LeRoy e colaboradores* [214]. Para cada doente foi preenchido um formulário pelo médico reumatologista responsável no qual constam informações relativas ao índice cutâneo de Rodnan e presença/ausência de anticorpos antinucleares no soro, **fibrose pulmonar** (*Pulmonar Fibrosis* - PF), hipertensão pulmonar, episódios de **úlceras digitais** (*Digital Ulcers* - DU), crise renal e terapêutica utilizada representada no **Anexo 1**.

No âmbito deste estudo, os doentes com SSc foram também divididos em três grupos [215], dependendo dos anos a que lhes foi diagnosticado a doença: **Grupo 1** (*Early-Stage*) – Doença diagnosticada há menos de um ano (inclusive); **Grupo 2** (*Mid-Stage*) – Doença diagnosticada há mais de um ano e menos de dez anos (inclusive); **Grupo 3** (*Late-Stage*) – Doença diagnosticada há mais de dez anos.

Como controlos saudáveis, vinte (20) voluntários isentos de doenças inflamatórias, dos quais 16 eram mulheres e 4 eram homens, com a idade média de $51,1 \pm 10,1$ anos e $55,8 \pm 9,1$ anos respetivamente, foram incluídos no estudo e a média de glóbulos brancos contados nas amostras sanguíneas foi de $7,34 \pm 1,79 \times 10^3$ cel/ μ L. Todos os participantes assinaram o consentimento informado.

Para ambas as populações, foram recolhidas amostras de sangue periférico colhido em tubos de EDTA-K3 e Heparina-lítio.

B. Caracterização da frequência de monócitos e células dendríticas no sangue periférico

Recorrendo ao sangue periférico colhido em tubos de EDTA-K3, 0.2mL foram incubados durante 10 minutos, no escuro, com os anticorpos monoclonais representados na **Tabela 2**. Neste passo, foi também adicionado o anticorpo monoclonal anti-CD54 para a identificação da ICAM-1. Posteriormente, foram adicionados 2mL de solução *FACS lysing* (BDBiosciences, São José, EUA), diluído em 1:10 em água destilada, e após 10 minutos de incubação, as células foram lavadas com 2mL de tampão fosfato-salino (PBS

- phosphate-buffered saline) (Dulbecco 1x, Biochrom Ag, Alemanha) (5min de centrifugação a 540xg). As células foram resuspendidas em 0.5mL de PBS e guardadas a 4°C até à aquisição no citómetro FACSCantoll (BDBiosciences, São José, EUA).

C. Análise funcional de monócitos e células dendríticas

C. 1. Estimulação *in vitro* com LPS e INF- γ de monócitos e células dendríticas

Um total de 0.5mL de sangue periférico, colhido num tubo heparinizado, e respetivo duplicado foram diluídos na proporção de 1/1 (vol/vol) em meio RPMI-1640 (Gibco, Escócia, UK), suplementado com 2mM de L-glutamina.

De modo a induzir a produção de citocinas na célula alvo, 100ng/ml de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (serotipo 055:B5-Sigma) e 100U/ml de interferão- γ recombinante (INF- γ ; Promega, Wisconsin, EUA) foram adicionados a um dos tubos, usando-se o outro como controlo (tubo sem estímulo). Em ambos os tubos, 10 μ g/mL de Brefeldina A de *Penicillium brefeldianum* (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados de modo a inibir a libertação de citocinas para o exterior da célula. Por fim, as amostras foram incubadas a 37 °C em meio estéril numa atmosfera húmida com 5 % de CO₂ durante 6 horas.

C. 2. Marcação intracitoplasmática para detetar a produção de citocinas

Após o período de incubação referido, foram feitas quatro alíquotas (0.2mL/tubo) com a amostra sujeita a estímulo e duas alíquotas (0.2mL/tubo) com a amostra tida como controlo. Na amostra sujeita a estímulo foi estudada a expressão de quatro moléculas diferentes (IL-6, IL-8, MIP-1 β /CCL4 e IP-10/CXCL10) enquanto que na amostra controlo foi estudada a expressão de duas moléculas (MIP-1 β /CCL4 e IP-10/CXCL10). Os níveis das citocinas IL-6 e IL-8, a nível basal (células sem estímulo), não foram medidos pelo facto de que, nos primeiros ensaios realizados com sangue periférico de doentes com SSc, a sua frequência de expressão demonstrar ser inferior a 5%.

Para a identificação das células dendríticas e monócitos, uma combinação de anticorpos representados na **Tabela 3** foi adicionada.

Após 10 minutos de incubação no escuro, as células foram fixadas e permeabilizadas com o reagente de fixação e permeabilização IntraprepTM (Beckman Coulter, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente foram adicionados anticorpos monoclonais conjugados com ficoeriterina (PE) direcionados às diferentes citocinas intracitoplasmáticas, representadas na **Tabela 4**. Pelo facto de

conterem a mesma fluorescência, cada anticorpo monoclonal anti-citocina foi colocado em tubos separados. Após um período de 10 minutos de incubação, as células foram lavadas com 2mL de PBS (5min de centrifugação a 540xg) e ressuspensas em 0.5mL de PBS antes da aquisição no citômetro de fluxo FACSCalibur (BDBiosciences, São José, EUA).

D. Aquisição por Citometria de Fluxo

A aquisição de dados foi realizado em dois citômetros de fluxo distintos, dependendo do procedimento aplicado, e em ambos foi requerido um número de 200 000 eventos/amostra.

Para a caracterização da frequência de DC e monócitos, a aquisição foi realizada no citômetro de fluxo FACSCantoll (BDBiosciences, São José, EUA) que permite a análise de 8 fluorescências diferentes.

Para a análise da produção de citocinas, a análise foi realizada no citometro de fluxo FACSCalibur (BDBiosciences, São José, EUA) que permite a análise de 4 fluorescências diferentes.

Os dados obtidos foram analisados recorrendo ao *software* Infinicyt (Cytognos, Espanha), **Figura 15**. Os valores absolutos, dados em célula por μl de sangue ($\text{Cel}/\mu\text{l}$), foram calculados recorrendo ao analisador hematológico (Coulter ACTdiff2, Beckman Coulter) em conjunto com os resultados obtidos pela citometria de fluxo.

E. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA), usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney U. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e mediana e as diferenças eram consideradas estatisticamente significativas quando o *p value* era inferior a 0.05.

Tabela 2 – Anticorpos monoclonais utilizados para o estudo do fenótipo dos monócitos e células dendríticas. A quantidade adicionada de cada anticorpo monoclonal foi de acordo com as instruções do fabricante.

Anticorpo Monoclonal	Fluorocromo	Clone	Marca	País
HLA-DR	Azul pacífico	Immu-357	Beckman Coulter	França
CD16	Isotiocianato de Fluresceína	CLB-Fc-gran/1	Sanquin	Holanda
CD54	Ficoeriterina	LB-2	BDBiosciences	EUA
CD123	Aloficocianina	AC145	Miltenyi Biotec	Alemanha
CD11c	Ficoeritrina Cianina 5	B-ly6	BDPharmingen	EUA
CD33	Ficoeritrina Cianina 7	D3HL60.251	Beckman Coulter	França
CD14	Aloficocianina H7	MφP9	BDBiosciences	EUA
CD45	Laranja pacífico	J.33	Beckman Coulter	França

Tabela 3 – Anticorpos monoclonais utilizados para o estudo de expressão de citocinas nos monócitos e células dendríticas. A quantidade adicionada de cada anticorpo monoclonal foi de acordo com as instruções do fabricante.

Anticorpo Monoclonal	Fluorocromo	Clone	Marca	País
HLA-DR	Complexo proteico clorofil-peridinina	L243	BDBiosciences	EUA
CD33	Aloficocianina	P67.6	BDBiosciences	EUA
Kit de Exclusão para DCs (CD3, CD14, CD19, CD56)	Fluoresceína Isocianato	-	Cytognos	Espanha

Tabela 4 – Anticorpos monoclonais utilizados para a identificação das citocinas nos monócitos e células dendríticas. A quantidade adicionada de cada anticorpo monoclonal foi de acordo com as instruções do fabricante.

Anticorpo Monoclonal	Fluorocromo	Clone	Marca	País
IL-6	Ficoeriterina	MQ2-6A3	BDPharmingen	EUA
IL-8		AS14	BDBiosciences	
CCL4		D21-1351	BDPharmingen	
CXCL10		6D4	BDPharmingen	

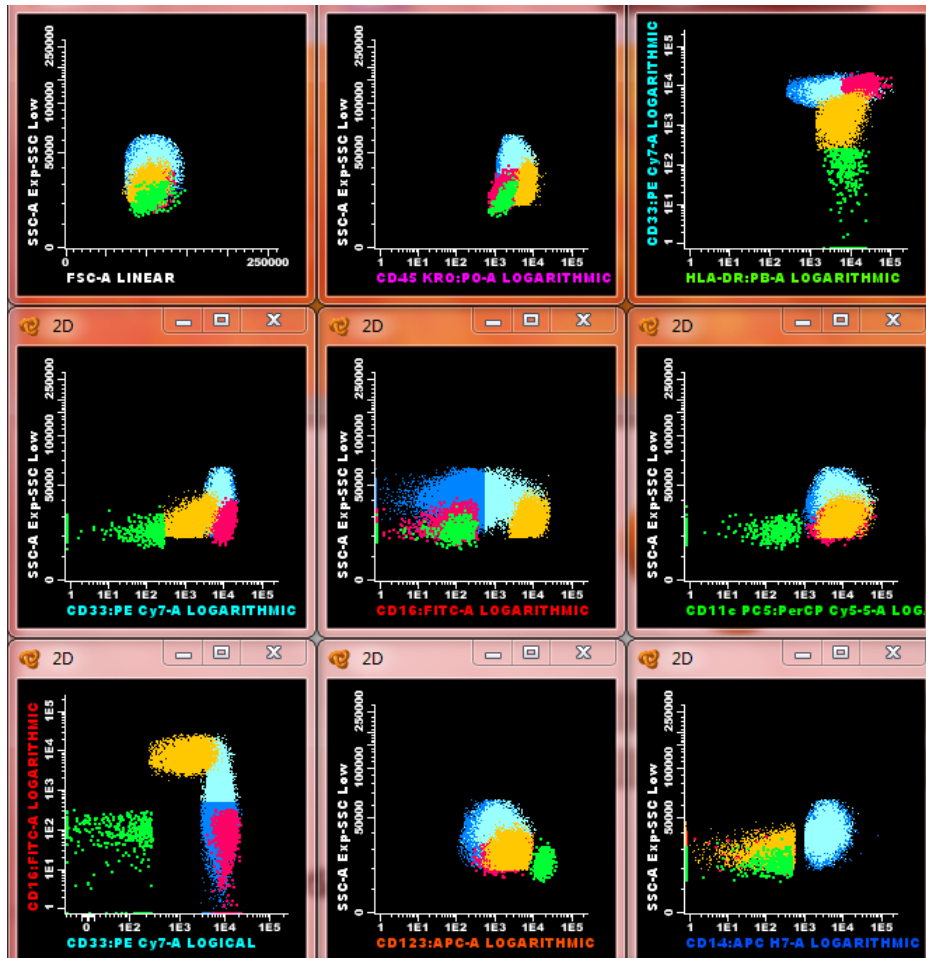


Figura 15 - Representação gráfica da estratégia utilizada para identificar as subpopulações de células dendríticas e monócitos mediante a utilização dos anticorpos monoclonais anti-HLA-DR, -CD16, -CD123, -CD11c, -CD33, -CD14 e -CD45. As diferentes subpopulações encontram-se representadas a diferentes cores: Monócitos CD16⁺ (Azul escuro), Monócitos CD16⁻ (Azul claro), DCs mielóides (Cor de rosa), DCs CD16⁺ (Cor de laranja), DCs plasmacitóides (Verde).

IV. RESULTADOS

A. Quantificação de monócitos no sangue periférico

A. 1. Frequência de monócitos no sangue periférico em Doentes com SSc de acordo com o subtipo, presença de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais

Pela análise da **Tabela 5**, verificou-se que a frequência e valor absoluto de monócitos encontravam-se aumentados em doentes com SSc, maioritariamente no subtipo limitado, atingindo significância estatística na subpopulação de monócitos que expressa CD16.

Em geral, diferenças estatisticamente significativas entre doentes com/sem PF ou episódios de DU não foram registadas. Contudo, a subpopulação de monócitos que expressa CD16 apresentava diferenças estatisticamente significativas no grupo de doentes sem PF e com DU, comparado com a população controlo.

Tabela 5 - Média±desvio padrão da frequência no total da celularidade (%) e valor absoluto (cel/μL) do total de monócitos e frequência relativa da subpopulação de CD14⁺CD16⁺ (% Subtipo) no total de monócitos, no sangue periférico da população controlo e de doentes com SSc. Os doentes foram subdivididos de acordo com o subtipo; com a presença de Fibrose pulmonar (PF) e pela ocorrência ou não de episódios de úlceras digitais (DU).

		CONTROLO (n=20)	SUBTIPO		Fibrose Pulmonar		Úlceras Digitais		
			Difuso (n=13)	Limitado (n=30)	Com (n=16)	Sem (n=27)	Com (n=17)	Sem (n=26)	
Monócito	Total	%	4.68±1.37	5.08±1.8 2	6.10±3.1 9	5.88±2.9 6	5.72±2.8 4	6.40±2.9 9	5.41±2.7 6
		cel/μL	341±112	476±207	464±246	503±240	446±229	531±241 ^e	429±223
	CD16 ⁺	%	0.35±0.14	0.50±0.3 3	0.70±0.5 8 ^b	0.58±0.4 1	0.67±0.5 8 ^d	0.68±0.4 5 ^e	0.61±0.5 6 ^f
		% Subtipo	7.65±3.16	9.59±4.4 9	10.9±4.1 4 ^b	9.70±4.5 2	10.9±4.0 7 ^d	10.5±4.0 6 ^e	10.4±4.4 2 ^f
		cel/μL	25.6±11.1	43.5±26. 8 ^a	51.2±39. 7 ^b	45.6±29. 8 ^c	50.7±39. 9 ^d	51.8±29. 6 ^e	46.9±40. 0 ^f

a) Difuso *versus* Controlo, p<0,05; b) Limitado *versus* Controlo, p<0,05; c) Com PF *versus* Controlo, p<0,05; d) Sem PF *versus* Controlo, p<0,05; e) Com DU *versus* Controlo, p<0,05; f) Sem DU *versus* Controlo, p<0,05.

A. 2. Frequência de monócitos no sangue periférico em Doentes com SSc de acordo com a duração da doença

De acordo com os anos a que lhes foi diagnosticado a doença, **Tabela 6**, verificou-se um aumento da frequência e valor absoluto do total de monócitos no grupo de doentes com SSc diagnosticada há menos de 1 ano, quando comparado com a população

controle e restantes grupos com SSc. Em contrapartida, a frequência e valor absoluto da subpopulação de monócitos que expressa CD16 tende a aumentar significativamente ao longo dos anos.

Tabela 6 - Média±desvio padrão da frequência no total da celularidade (%) e valor absoluto (cel/μL) do total de monócitos e frequência relativa da subpopulação de CD14⁺CD16⁺ (% Subtipo) no total de monócitos no sangue periférico da população controle e de doentes com SSc. Os doentes com SSc foram divididos de acordo com a duração da doença, em anos.

		CONTROLO (n=20)	Duração da doença (anos)			
			≤1 (n=6)	>1-≤10 (n=21)	>10 (n=16)	
Monócito	Total	%	4.68±1.37	6.47±1.05 ^a	5.58±3.48	5.80±2.43
		cel/μL	341±112	686±193 ^{a,d}	412±214	460±232 ^e
	CD16 ⁺	%	0.35±0.14	0.50±0.40	0.68±0.62 ^b	0.64±0.40 ^c
		% Subtipo	7.65±3.16	7.32±4.69 ^d	11.3±4.54 ^b	10.6±3.18 ^c
		cel/μL	25.6±11.1	47.5±34.1	48.2±38.5 ^b	50.2±35.7 ^c

a) ≤1anos *versus* Controle, p<0,05; b) >1-≤10 anos *versus* Controle, p<0,05; c) >10 anos *versus* Controle, p<0,05; d) ≤1anos *versus* >1-≤10 anos, p<0,05; e) ≤1anos *versus* >10 anos, p<0,05.

B. Quantificação de células dendríticas no sangue periférico

B. 1. Frequência de células dendríticas no sangue periférico em Doentes com SSc de acordo com o subtipo, presença de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais

Pela análise dos resultados apresentados na **Tabela 7**, verificou-se que a frequência e valor absoluto da população total de DCs encontravam-se aumentados nos dois subtipos da doença, destacando o aumento da subpopulação CD16⁺.

Relativamente aos achados clínicos, foi registado um aumento da frequência e valor absoluto da subpopulação de DCs que expressa CD16 nos doentes que não desenvolveram PF e que sofreu episódios de DU, atingindo significado estatístico neste último grupo.

No que refere à frequência e valor absoluto das células dendríticas mielóides e plasmacitóides não se verificaram alterações significativas de acordo com os subtipos da doença ou achados clínicos.

Tabela 7 - Média±desvio padrão da frequência no total da celularidade (%) e valor absoluto (cel/μL) do total de DCs e frequência relativa das subpopulações mielóide, plasmacitóide e CD16⁺ (% Subtipo) no total de DCs no sangue periférico da população controle e de doentes com SSc. Os doentes foram subdivididos de acordo com o subtipo; com a presença de Fibrose pulmonar (PF) e por fim pela ocorrência ou não de episódios de úlceras digitais (DU).

		CONTROLO (n=20)	SUBTIPO		Fibrose Pulmonar		Úlceras Digitais		
			Difuso (n=13)	Limitado (n=30)	Com (n=16)	Sem (n=27)	Com (n=17)	Sem (n=26)	
Célula Dendrítica	Total	%	0.64±0.20	0.84±0.59	0.93±0.65	0.76±0.56	0.99±0.66 ^a	0.96±0.70	0.86±0.59
		cel/μL	44.7±13.0	70.3±44.1	68.5±44.4	60.1±40.6	74.6±45.5 ^a	72.5±43.7 ^b	67.0±44.5
	CD16 ⁺	%	0.47±0.17	0.64±0.51	0.75±0.59	0.58±0.49	0.80±0.59 ^a	0.76±0.64	0.68±0.51
		% Subtipo	71.4±10.5	70.7±17.8	74.2±16.7	69.1±20.8	76.0±13.9	72.5±20.8	73.5±14.4
		cel/μL	32.4±11.3	53.9±40.7	54.9±41.1	45.5±37.6	60.2±41.8 ^a	57.1±42.8	53.1±39.7
	Mielóide	%	0.15±0.05	0.17±0.20	0.15±0.08	0.16±0.19	0.16±0.081	0.17±0.18	0.15±0.09
		% Subtipo	24.1±9.91	23.9±14.8	21.4±14.3	26.0±18.7	19.8±10.6	23.4±19.2	21.4±10.7
		cel/μL	10.4±3.71	13.9±12.4	11.3±6.09	12.6±12.1	11.8±5.46	13.1±11.5	11.5±6.14
	Plasmacitóide	%	0.03±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02	0.02±0.01	0.03±0.02	0.03±0.01	0.03±0.02
		% Subtipo	4.44±2.01	5.38±4.75	4.44±4.18	4.79±4.41	4.69±4.36	4.17±3.22	5.08±4.91
		cel/μL	1.98±1.17	2.46±1.36	2.23±1.76	1.95±1.24	2.52±1.82	2.29±1.26	2.31±1.84

a) Sem FB versus Controlo, p<0,05; b) Com UD versus Controlo, p<0,05.

B. 2. Frequência de células dendríticas no sangue periférico em Doentes com SSc de acordo com a duração da doença

Ao longo dos três estadios da doença, regista-se um aumento significativo da frequência e valor absoluto da subpopulação de DCs CD16⁺ e consequentemente, do total de DCs. Em contrapartida, ocorre a diminuição de DCs mielóides e plasmacitóides ao longo dos anos.

Tabela 8 - Média±desvio padrão da frequência no total da celularidade (%) e valor absoluto (cel/μL) do total de DCs e frequência relativa das subpopulações mielóide, plasmacitóide e CD16⁺ (% Subtipo) no total de DCs no sangue periférico da população controle e de doentes com SSc. Os doentes com SSc foram divididos de acordo com a duração da doença, em anos.

		CONTROLE (n=20)	Duração da doença (anos)		
			≤1 (n=6)	>1-≤10 (n=21)	>10 (n=16)
Célula Dendrítica	Total	%	0.64±0.20	0.73±0.54	0.89±0.65
		cel/μL	44.7±13.0	69.5±44.7	78.8±46.1 ^b
	CD16 ⁺	%	0.47±0.17	0.55±0.54	0.70±0.57
		% Subtipo	71.4±10.5	63.1±24.6	76.3±12.7
		cel/μL	32.4±11.3	50.8±47.2	62.4±43.2 ^b
	Mielóide	%	0.15±0.05	0.14±0.03	0.14±0.09
		% Subtipo	24.1±9.91	29.9±24.3	21.1±12.4
		cel/μL	10.4±3.71	14.5±5.66 ^c	9.79±5.77
	Plasmacitóide	%	0.03±0.02	0.04±0.03	0.03±0.02
		% Subtipo	4.44±2.01	7.02±4.29	5.22±5.21
		cel/μL	1.98±1.17	4.28±2.63 ^{a,c}	1.95±1.14 ^d

a) ≤1anos versus Controlo, p<0,05; b) >10 anos versus Controlo, p<0,05; c) ≤1anos versus >1-≤10 anos, p<0,05; d) ≤1anos versus >10 anos, p<0,05.

C. Frequência de citocinas e quimocinas expressas em monócitos e células dendríticas no sangue periférico

C. 1. Frequência de citocinas e quimocinas expressas de acordo com o subtipo da doença

Pela análise da **Figura 15** verificou-se que, na ausência de estímulo (nível basal), a frequência das células em estudo (monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide) a produzir CCL4 e CXCL10 é superior em doentes com SSc, maioritariamente do subtipo difuso.

Após estimulação *in vitro* com LPS e IFN-γ, a frequência de células a produzir IL-6, IL-8, CCL4 e CXCL10 manteve-se superior em doentes com SSc, particularmente no subtipo difuso, quando comparado com a população controle. É importante notar o aumento significativo de DC CD16⁺ a produzir IL-8.

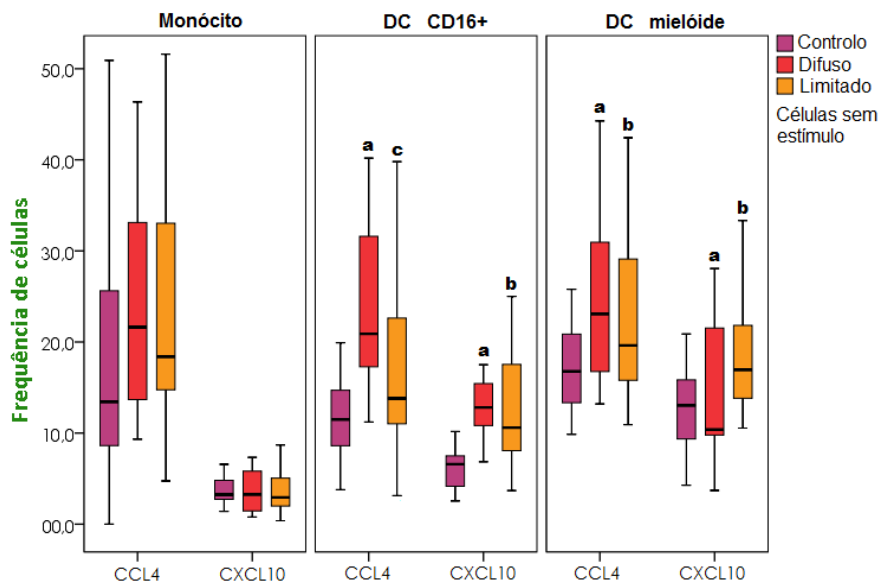


Figura 16 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) a produzir CCL4 e CXCL10 na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc, sem estímulo *in vitro*. a) Difuso versus Controlo, $p<0,05$; b) Limitado versus Controlo, $p<0,05$; c) Limitado versus Difuso, $p<0,05$.

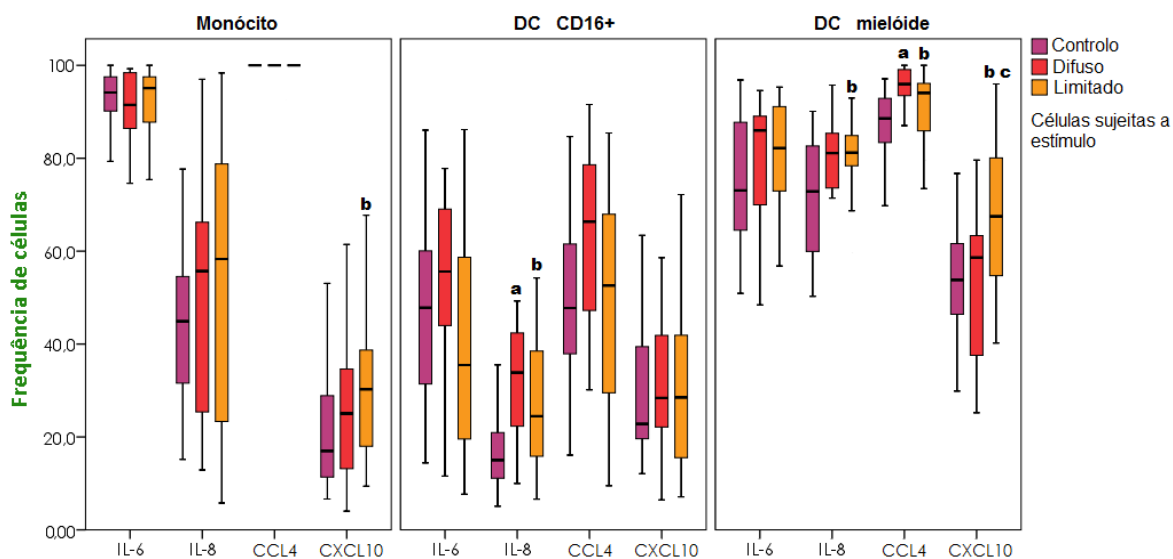


Figura 17 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) a produzir IL-6, IL-8, CCL4 e CXCL10 na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . a) Difuso versus Controlo, $p<0,05$; b) Limitado versus Controlo, $p<0,05$; c) Limitado versus Difuso, $p<0,05$.

Relativamente à quantidade de citocina expressa por célula dada pela média de intensidade de fluorescência, representada na **Figura 17** e **Figura 18**, verificou-se uma ligeira diminuição deste valor nos doentes com SSc, nomeadamente, para a CXCL10 no grupo de células sem estímulo e para a IL-6 e IL-8 nas células após estímulo.

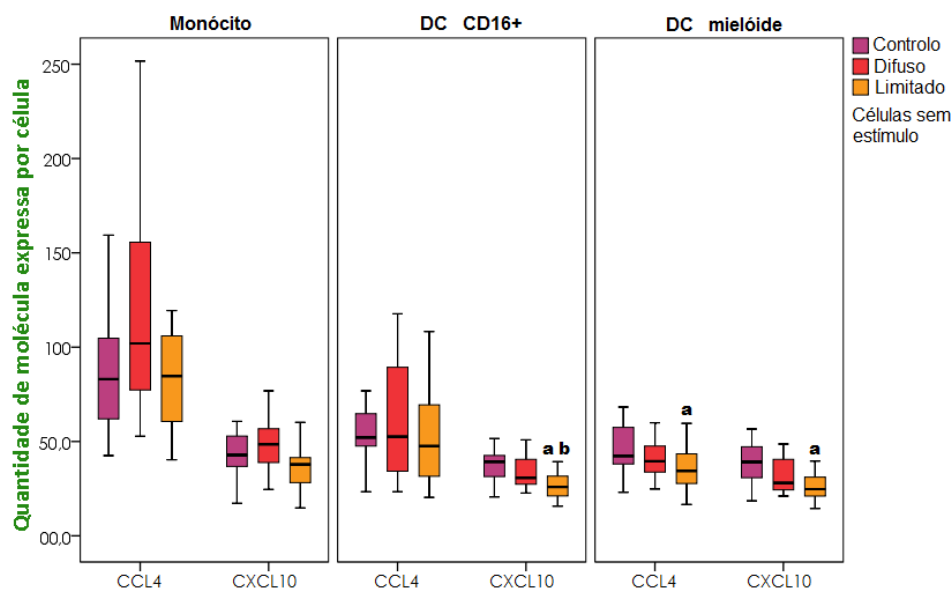


Figura 18 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc, sem estímulo *in vitro*. a) Limitado versus Controlo, $p < 0,05$; b) Difuso versus Limitado, $p < 0,05$.

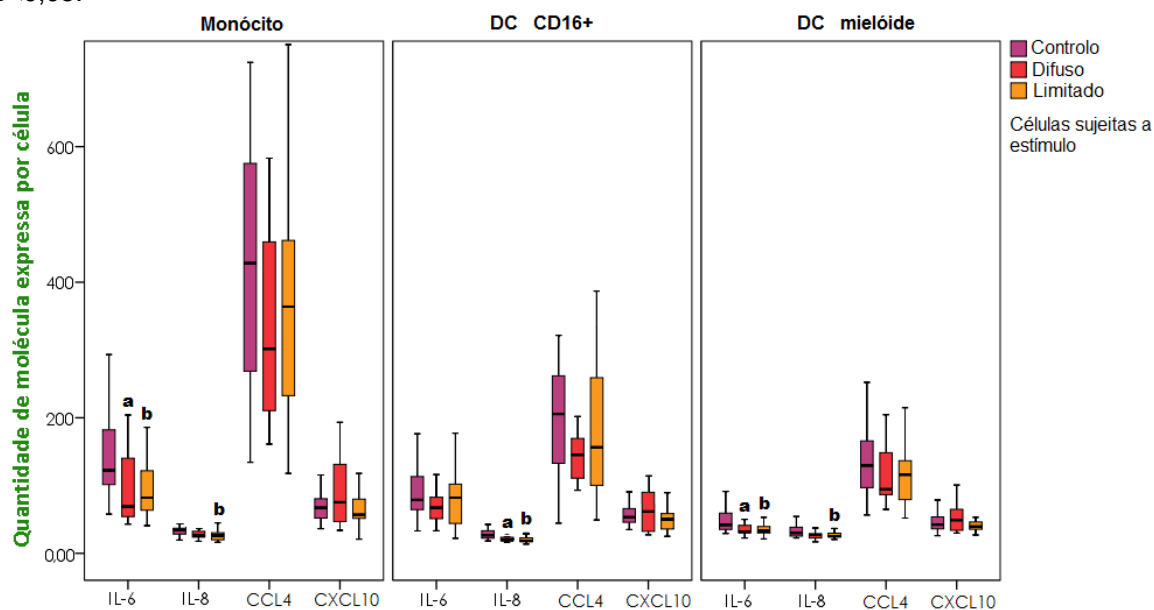


Figura 19 - Representação da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . a) Difuso versus Controlo, $p < 0,05$; b) Limitado versus Controlo, $p < 0,05$.

C. 2. Frequência de citocinas e quimocinas expressas de acordo com a presença de fibrose pulmonar ou episódios de úlceras digitais

Comparando a frequência de células a produzir citocinas e quimocinas em doentes com e sem PF, representa na **Figura 19** e **Figura 20**, observou-se que na presença de PF estes valores tendem a estar aumentados tanto a nível basal como após estímulo *in vitro*. Salienta-se o aumento significativamente estatístico dos valores de IL-8 nas populações celulares em estudo.

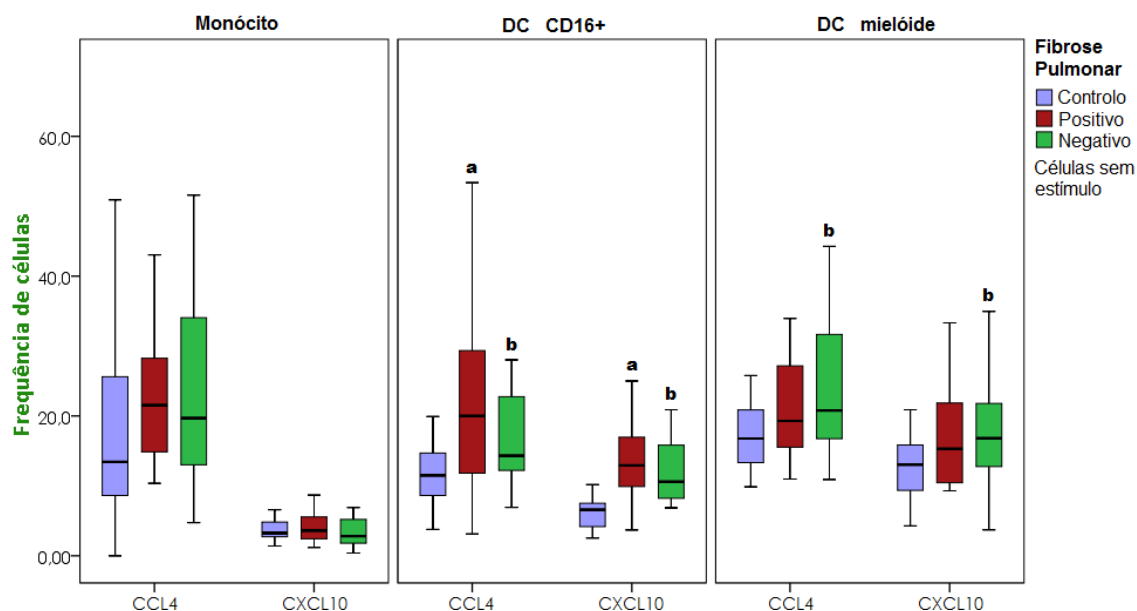


Figura 20 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) a produzir CCL4 e CXCL10 na população controlo e em doentes com SSc na presença/ausência de PF, sem estímulo *in vitro*. a) Com PF versus Controlo, $p < 0,05$; b) Sem PF versus Controlo, $p < 0,05$.

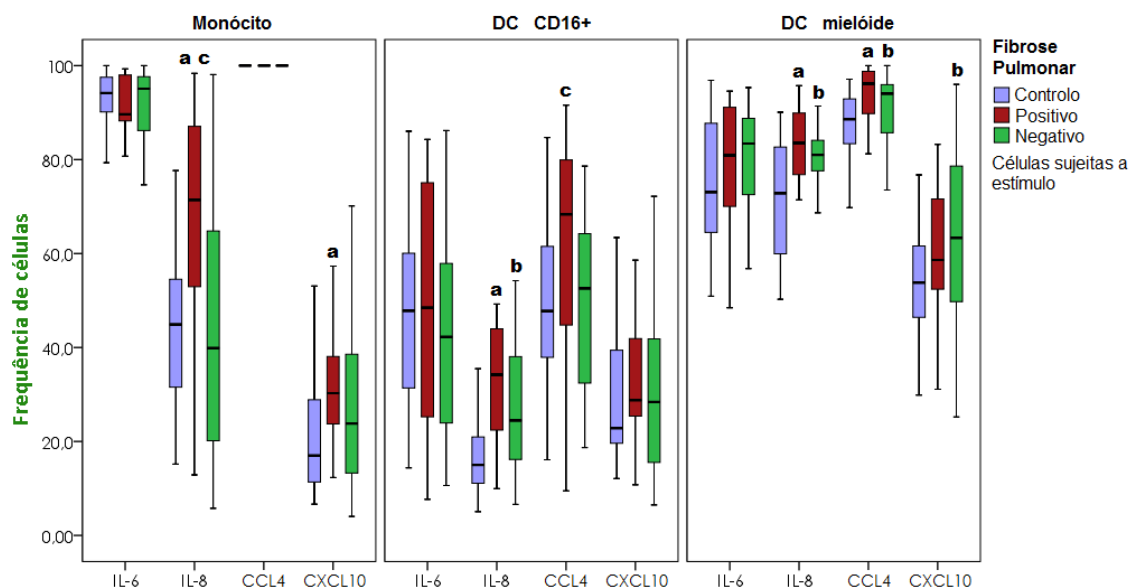


Figura 21 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) a produzir IL-6, IL-8, CCL4 e CXCL10 na população controlo e em doentes com SSc na presença/ausência de PF, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN-γ. a) Com PF versus Controlo, $p < 0,05$; b) Sem PF versus Controlo, $p < 0,05$; c) Com PF versus Sem PF, $p < 0,05$.

Tal como observado no caso dos subtipos de SSc, a quantidade de citocina expressa por célula, representada na **Figura 21** e **Figura 22**, demonstra uma ligeira diminuição no grupo de doentes com e sem PF, nomeadamente para a CXCL10 no grupo de células sem estímulo e para a IL-6 e IL-8, nas células após estímulo. Verificou-se igualmente que esta diminuição era mais acentuada no grupo sem PF.

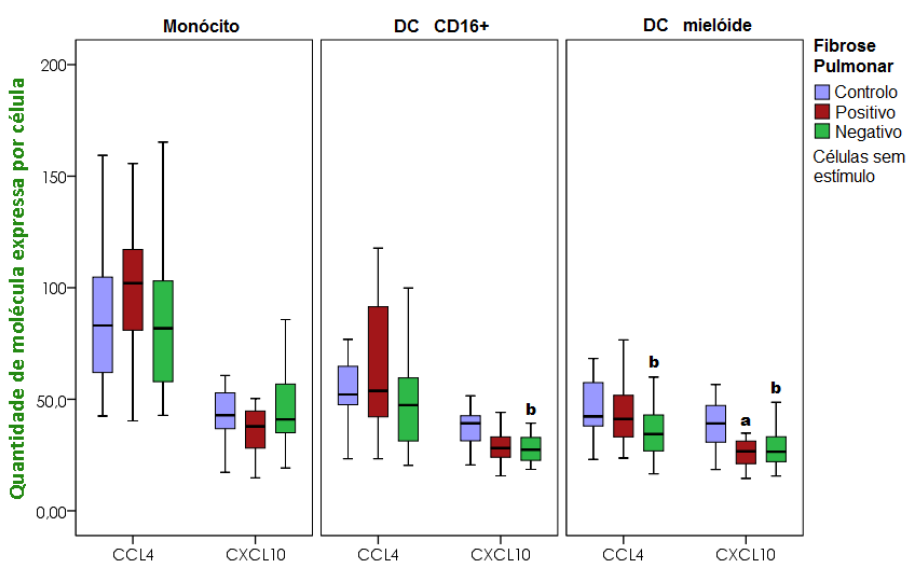


Figura 22 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) na população controlo e em doentes com SSc na presença/ausência de PF, sem estímulo *in vitro*. a) Com PF versus Controlo, $p < 0,05$, b) Sem PF versus Controlo, $p < 0,05$.

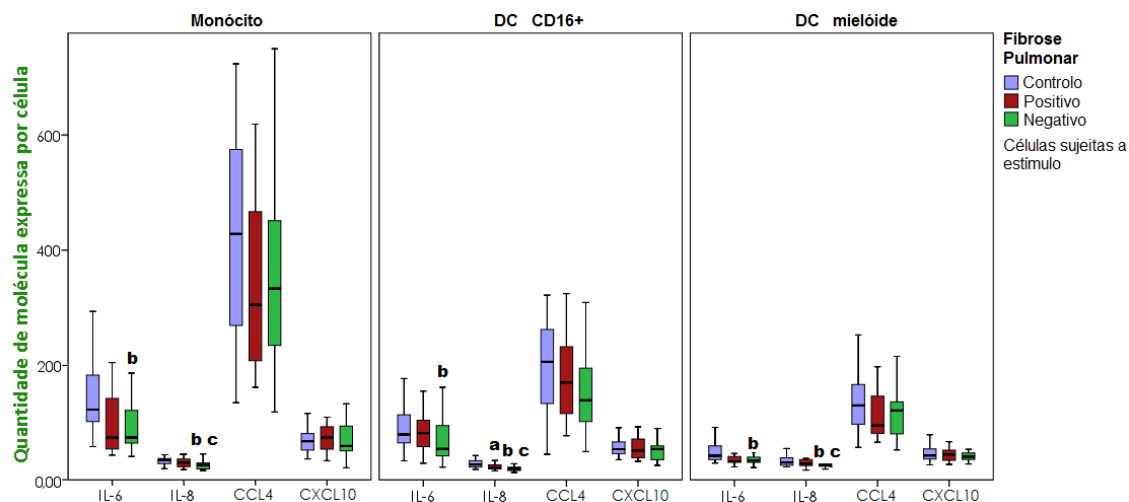


Figura 23 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) na população controlo e em doentes com SSc na presença/ausência de PF, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . a) Com PF *versus* Controlo, $p < 0,05$, b) Sem PF *versus* Controlo, $p < 0,05$; c) Com PF *versus* Sem PF, $p < 0,05$.

Dividindo os doentes de acordo com a presença ou não de episódios de DU, observou-se um aumento significativo da frequência de células a produzir CCL4, tanto a nível basal como após estímulo, e de IL-8, após estimulação. É importante referir que, principalmente após estimulação das células, o grupo de doentes com DU apresenta valores superiores ao grupo de doentes sem DU.

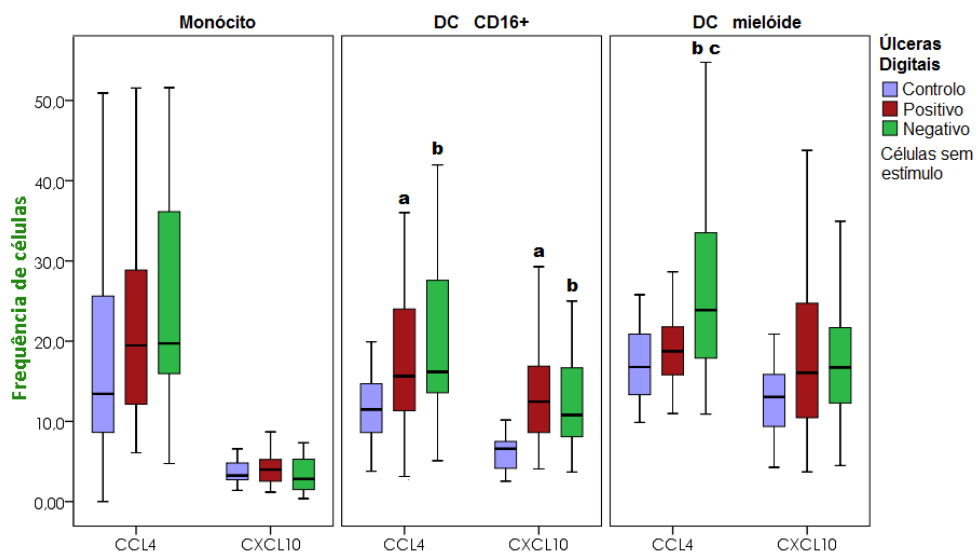


Figura 24 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) a produzir CCL4 e CXCL10 na população controlo e em doentes com SSc na presença/ausência de DU, sem estímulo *in vitro*. a) Com DU *versus* Controlo, $p < 0,05$; b) Sem DU *versus* Controlo, $p < 0,05$; c) Com DU *versus* Sem DU, $p < 0,05$.

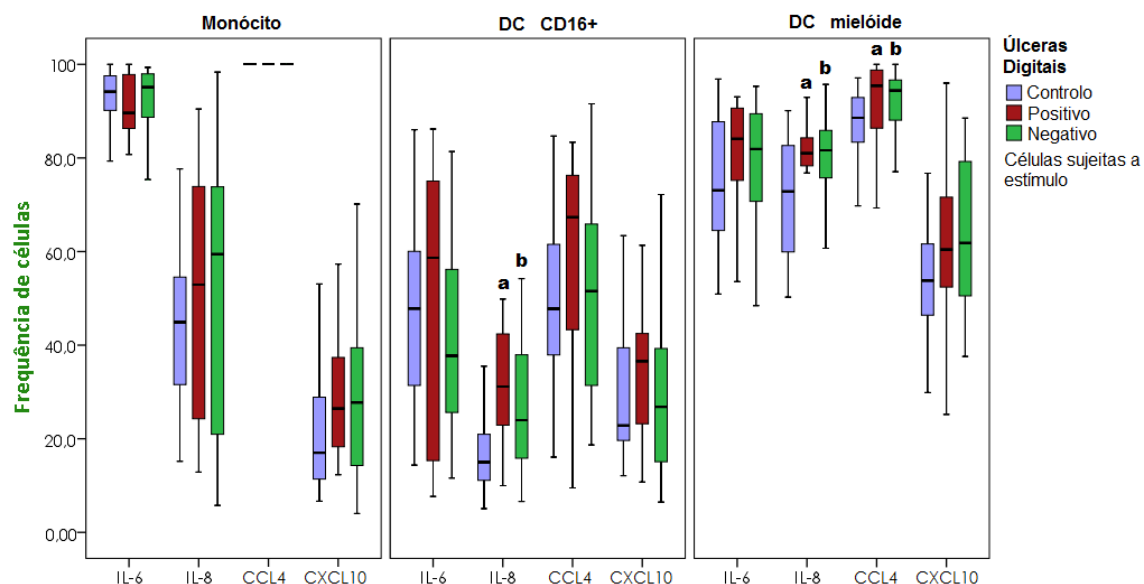


Figura 25 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) a produzir IL-6, IL-8, CCL4 e CXCL10 na população controlo e em doentes com SSc na presença/ausência de DU, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . a) Com DU versus Controlo, $p < 0,05$; b) Sem DU versus Controlo, $p < 0,05$.

Do mesmo modo que para os doentes divididos de acordo com o subtipo ou presença de fibrose, a quantidade de citocina expressa por célula, representado na **Figura 25** e **Figura 26**, demonstra uma ligeira diminuição no grupo de doentes com e sem DU, nomeadamente para a CXCL10, na ausência de estímulo, e para a IL-6 e IL-8, após estimulação. Observou-se que o grupo de doentes com DU apresenta uma diminuição mais acentuada.

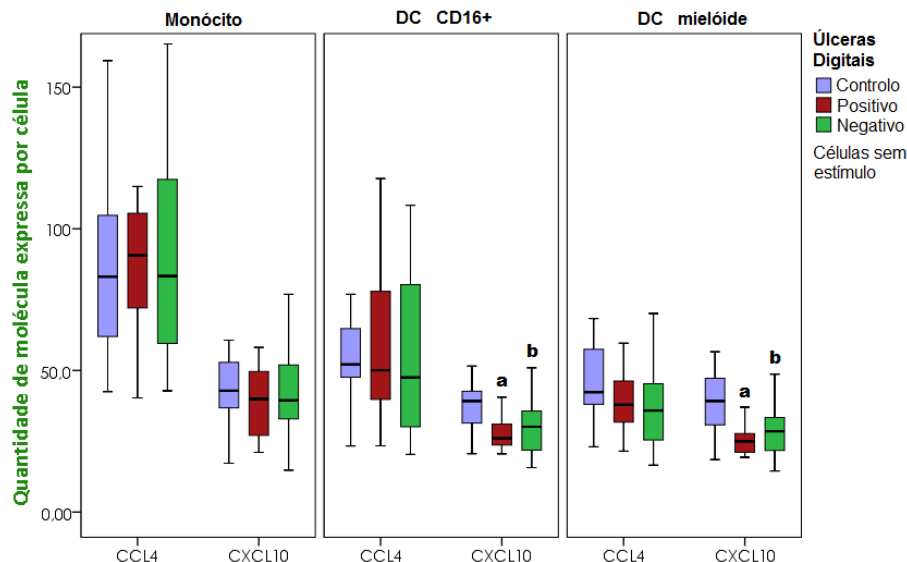


Figura 26 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) na população controlo e em doentes com SSc na presença/ausência de DU, sem estímulo *in vitro*. a) Com DU versus Controlo, $p < 0,05$; b) Sem DU versus Controlo, $p < 0,05$.

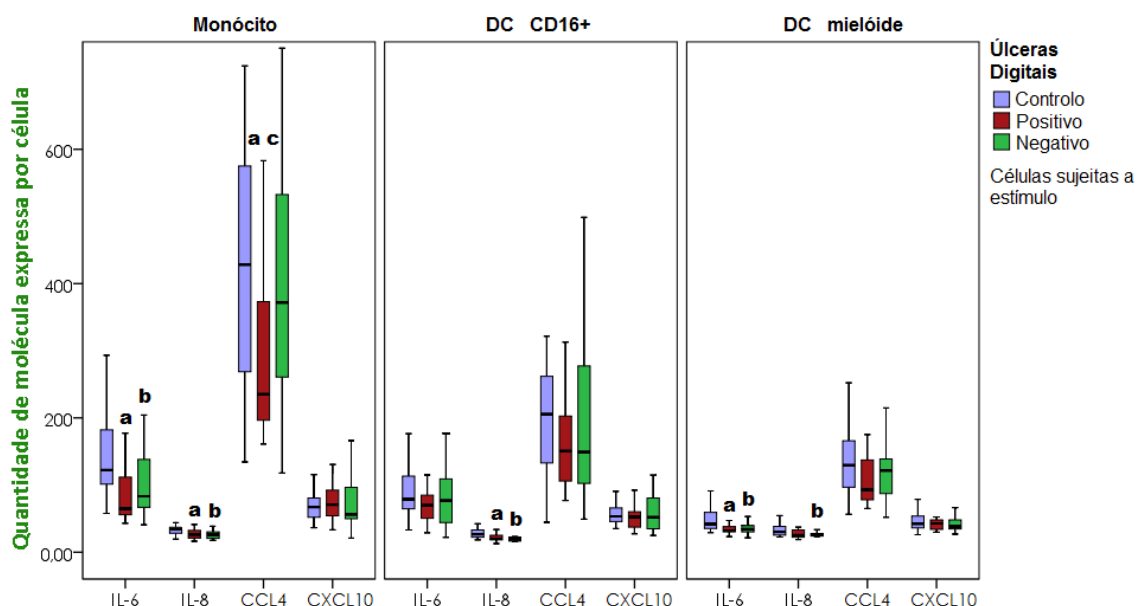


Figura 27 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) na população controlo e em doentes com SSc na presença/ausência de DU, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . a) Com DU versus Controlo, $p < 0,05$; b) Sem DU versus Controlo, $p < 0,05$; c) Com DU versus Sem DU, $p < 0,05$.

C. 3. Frequência de citocinas e quimocinas expressas de acordo com a duração da doença

Analisando a frequência de células a produzir as proteínas em estudo representado na **Figura 27** e **Figura 28**, verificou-se que em geral este valor tende a aumentar

sucessivamente ao longo dos três grupos, tanto sem estímulo como após estímulo *in vitro*.

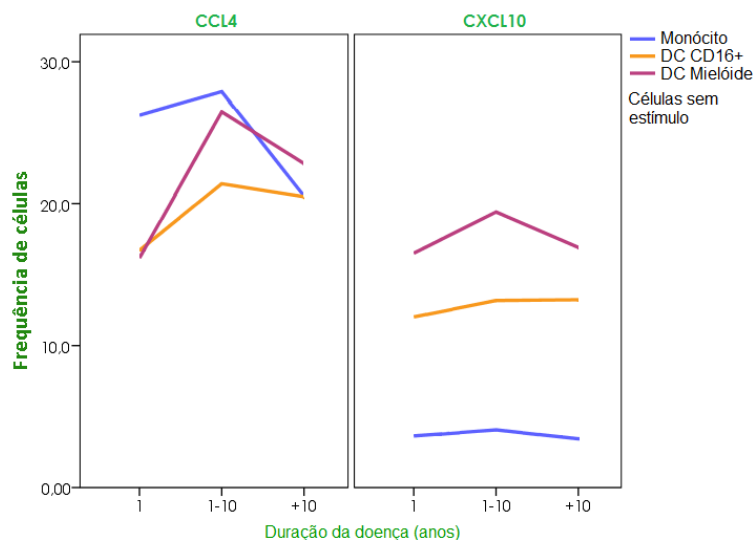


Figura 28 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) a produzir CCL4 e CXCL10 nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos, sem estímulo *in vitro*.

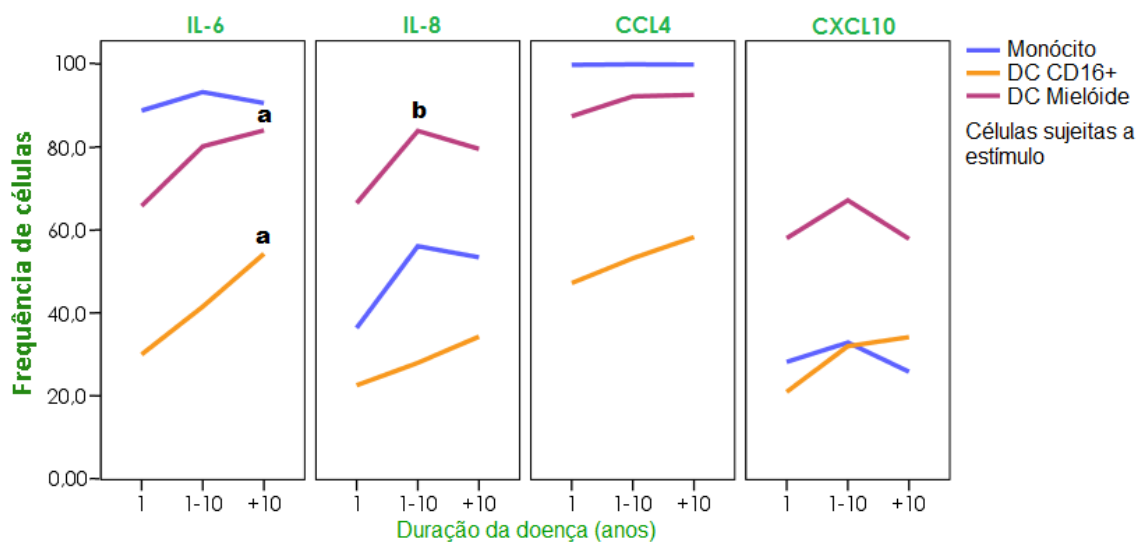


Figura 29 - Representação gráfica da frequência de células (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) a produzir IL-6, IL-8, CCL4 e CXCL10 nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . a) ≤ 1 anos *versus* >10 anos, $p < 0,05$; b) ≤ 1 anos *versus* $>1-10$ anos, $p < 0,05$.

No que se refere à quantidade de citocina expressa por célula, verificou-se algumas diferenças na IL-6 e CCL4, após estímulo *in vitro*, que demonstram uma tendência para aumentar ao longo dos anos.

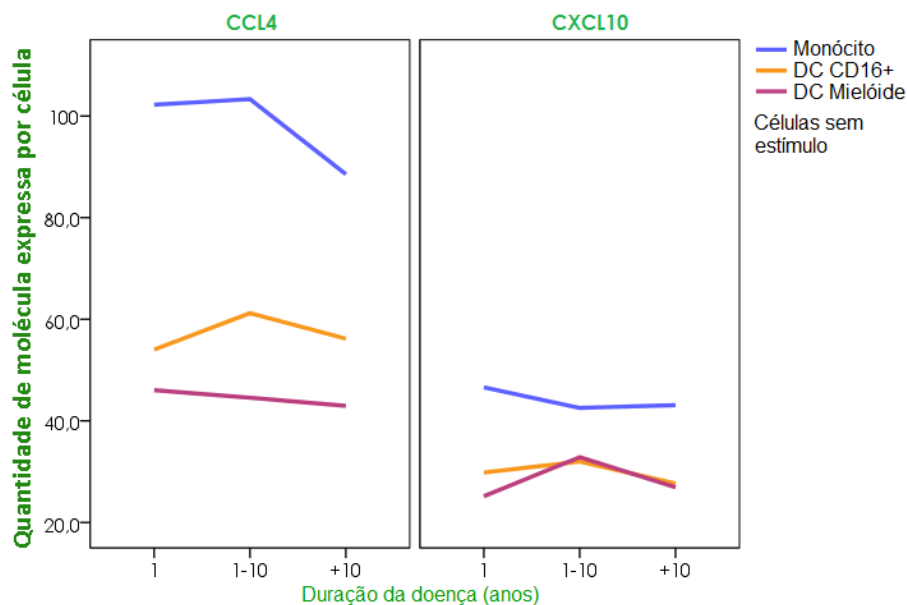


Figura 30 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos, sem estímulo *in vitro*.

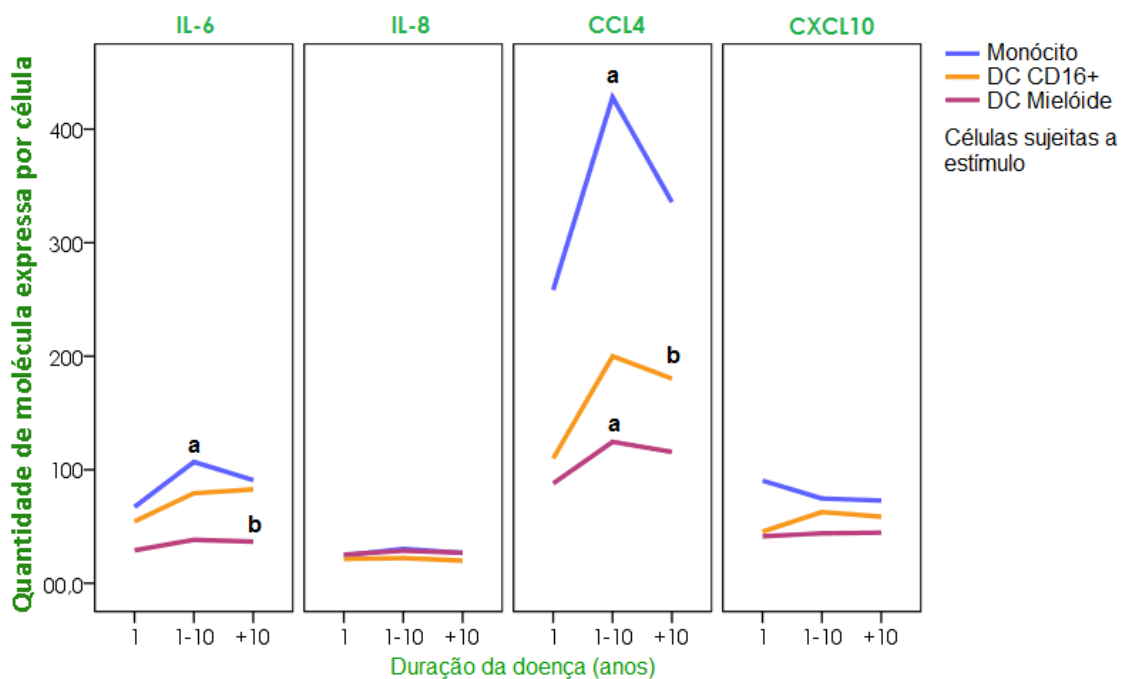


Figura 31 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula (monócito, DC CD16+ e DC mielóide) nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos, após estímulo *in vitro* com LPS e IFN- γ . a) ≤ 1 anos *versus* $>1-10$ anos, $p < 0,05$; b) ≤ 1 anos *versus* >10 anos.

D. Frequência de ICAM-1 (CD54) expressa monócitos e células dendríticas no sangue periférico

D. 1. Frequência de ICAM-1 (CD54) expressa de acordo com o subtipo de SSc, presença de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais

Pela análise da **Tabela 7**, constatou-se que doentes do subtipo difuso demonstram uma diminuição significativa na expressão da molécula ICAM-1, tanto em monócitos como em DCs, quando comparados com o grupo de doentes do subtipo limitado. Uma ligeira diminuição na expressão de ICAM-1 é também observada em doentes com PF e com DU, quando comparada com os resultados obtidos para doentes sem PF e sem DU, respetivamente.

Tabela 9 - Média±desvio padrão da quantidade de ICAM-1 (CD54) expressa por célula (MFI) na população controlo e doentes com SSc. Os doentes foram subdivididos de acordo com o subtipo; com a presença de Fibrose pulmonar (PF) e por fim pela ocorrência ou não de episódios de úlceras digitais (DU).

		CONTROLO (n=20)	SUBTIPO		Fibrose Pulmonar		Úlceras Digitais	
			DIFUSO (n=13)	LIMITADO (n=30)	Com (n=16)	Sem (n=27)	Com (n=17)	Sem (n=26)
ICAM-1	Monócito							
	CD16 ⁺	1671±709.1	1522±502.6	1906±580.3	1652±530.2	1870±603.1	1693±545.5	1845±603.0
	CD16 ⁻	895.4±275.7	737.6±214.0 ^b	920.3±224.9	794.9±195.3	906.1±250.7	790.5±226.4	908.8±233.2
	CD16 ⁺	1347±611.1	1129±412.5 ^b	1565±517.4	1321±380.4	1497±592.5	1245±370.0	1544±576.8
	Mielóide	1299±444.7	993.3±419.5 ^b	1350±418.0	1092±381.0	1329±465.1	1033±449.8 ^d	1366±400.3
	Plasma-citóide	853.8±256.0	604.2±148.3 ^{a,b}	817.7±265.0	664.9±207.4 ^c	804.9±268.1	690.2±236.6	789.4±260.7

a) Difuso *versus* Controlo, p<0,05; b) Difuso *versus* Limitado, p<0,05; c) Com PF *versus* Controlo, p<0,05; d) Com DU *versus* Sem DU, p<0,05.

D. 2. Frequência de ICAM-1 (CD54) expressa de acordo com a duração da doença

Quando analisada a expressão da molécula ICAM-1 nos monócitos e DCs de acordo com a duração da doença, verificou-se que este valor varia de modo inconstante entre os três grupos de doentes. Contudo, no grupo cuja doença foi diagnosticada há

menos de 1 anos, a quantidade de ICAM-1 expressa em DCs mielóides e plasmacitóides apresentam uma diminuição significativa.

Tabela 10 - Média±desvio padrão da quantidade de ICAM-1 (CD54) expressa por célula (MFI) na população controlo e doentes com SSc, divididos de acordo com a duração da doença.

		CONTROLO (n=20)	Duração da doença (anos)			
			≤1 (n=6)	>1-≤10 (n=21)	>10 (n=16)	
ICAM-1	Monócito	CD16 ⁺	1671±709.1	1550±550.7	1913±675.8	1706±410.6
		CD16 ⁻	895.4±275.7	778.4±266.7	924.9±270.7	812.3±142.2
	Célula Dendrítica	CD16 ⁺	1347±611.1	1320±500.3	1492±486.2	1388±603.0
		Mielóide	1299±444.7	993.9±581.7 ^b	1365±405.3	1162±412.4
		Plasmacitóide	853.8±256.0	582.8±186.0 ^{a,b}	833.3±296.4	704.8±161.9

a) ≤1anos *versus* Controlo, p<0,05; b) ≤1anos *versus* >1-≤10 anos, p<0,05.

V. DISCUSSÃO

A Esclerose Sistémica é uma desordem multi-sistémica caracterizada por disfunção imune e vascular, e fibrose excessiva. A rápida progressão e o envolvimento de diversos órgãos culminam na morte do doente, exigindo a reunião de esforços para o entendimento dos eventos subjacentes ao seu aparecimento e progressão e, deste modo, para o desenvolvimento de biomarcadores que delineiem o prognóstico da doença.

O facto de o dano vascular e a desregulação imune ocorrerem nos primeiros estadios da doença e precederem em meses ou anos o desenvolvimento de fibrose, faz deles alvos chave para a compreensão da fisiopatologia da SSc [168]. Adicionalmente, o aparecimento de infiltrados de células mononucleares na pele antes do aparecimento de alguma evidência de fibrose, indicia a atividade das células do sistema imune no estadio inicial da doença [216, 217]. Curiosamente estudos demonstram que os fibroblastos de doentes com SSc não apresentam alterações no perfil genético, comprovando que a estimulação da síntese de colagénio é exógena e deste modo, a fase fibrótica pode representar uma consequência da estimulação por células inflamatórias [218].

Neste contexto, insere-se a importância do estudo de populações celulares, como DCs e monócitos, capazes de iniciar e manipular uma resposta imune e, deste modo, mediar a interação entre células endoteliais e fibroblastos.

A. Quantificação de monócitos e células dendríticas do sangue periférico de doentes com SSc

Após tratamento e análise dos resultados, verificou-se que os dois tipos de células em estudo, monócitos e DCs, tendem a estar aumentados no sangue periférico de doentes com SSc em comparação a indivíduos saudáveis. Estes valores vão ao encontro com alguns artigos publicados no âmbito desta e de outras doenças autoimunes.

Contudo, considerando a diferença registada entre as contagens de glóbulos brancos no sangue periférico entre os dois subtipos de SSc, (Difuso = $9,75 \pm 2,54 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$ e Limitado = $7,65 \pm 1,66 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$), seria de esperar que a frequência das células em estudo se distinguisse com significância entre os dois subtipos da doença, o que não aconteceu. Este facto pode ser justificado com o número reduzido de doentes com SSc do subtipo difuso em comparação ao grupo de doentes com SSc do subtipo limitado. Por outro lado, pode supor-se que as diferenças a nível de frequências celulares entre doentes está relacionada com a forma como estes são agrupados. Deste modo foi também realizado o agrupamento de doentes consoante existência de episódios de úlceras digitais, fibrose pulmonar, e tempo de duração da doença.

Agrupando os doentes de acordo com a presença de episódios de DU, verificou-se que a frequência do total de monócitos assim como do total de DCs apresentou valores ligeiramente mais elevados nos doentes que apresentavam DU. Neste caso, destacou-se o aumento de duas subpopulações em particular, monócitos CD14⁺CD16⁺ e de DCs CD16⁺. Correlacionando a função desempenhada por estas subpopulações, nomeadamente na resposta inflamatória, com o facto de se encontrarem particularmente elevadas no sangue periférico neste grupo de doentes, sugere uma possível relação entre estas linhas celulares e a severidade da doença, podendo estas populações surgir como indicadores de dano tecidual. De facto, as DU são lesões necróticas resultantes da manifestação vascular, que se acredita ocorrer precocemente na patogénese da SSc, e deste modo é considerada na literatura como um dos marcadores da severidade da doença [180].

De acordo com a presença de PF, verificou-se que doentes que não têm fibrose pulmonar apresentam um aumento significativo da frequência das subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁺ e de DCs CD16⁺, em comparação ao controlo. A presença de fibrose pulmonar traduz-se em morte tecidual e deste modo pode ser associada a um agravamento do estado clínico do doente. A diminuição da frequência das referidas subpopulações na presença fibrose pulmonar pode dever-se possivelmente à maior infiltração das células nos tecidos lesados.

Relacionando estes dados com os resultados discutidos para doentes com/sem episódios de DU considerava-se espectável um aumento da frequência subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁺ e de DCs CD16⁺ em doentes com um estado clínico mais severo. Considerando que o agrupamento foi realizado apenas consoante a presença ou não de PF, outros achados clínicos, como DU, podem variar de entre os doentes que constituem cada um dos grupos e deste modo induzir a variação dos parâmetros em análise. Assim, doentes com SSc deveriam ser agrupados consoante a presença/ausência de diversas características clínicas, aproximação dada pelo subtipo da doença. Porém, com a população em estudo (43 doentes), traduzir-se-ia na obtenção de grupos de amostra reduzidos, comprometendo a fiabilidade dos resultados estatísticos.

Avaliada no âmbito de outras doenças, nomeadamente na área da oncologia, a presença de macrófagos CD16⁺ ativos na periferia parece estar associada a dano tecidual e deste modo são definidos os macrófagos CD16⁺ como marcadores da atividade destas mesmas alterações [219]. Adicionalmente, o aumento da atividade de células dendríticas CD16⁺ na periferia encontra-se também associado à fisiopatologia de doenças autoimunes como o SLE [205]. Com base nestas observações podemos

também postular a relação entre o aumento das subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁺ e de DCs CD16⁺ com as lesões tecidulares na SSc.

Por fim, os doentes foram também agrupados consoante o ano em que lhes foi diagnosticado SSc, considerando que um indivíduo que apresenta a doença há menos de 1 ano encontra-se num ambiente imunológico diferente do de um indivíduo que já tem a doença há mais de 10 anos.

Após análise estatística dos resultados, verificou-se que a frequência do total de monócitos no sangue de doentes com SSc há menos de um ano é substancialmente superior ao grupo de doentes com SSc há mais de 10 anos, correspondendo a aproximadamente ao dobro do valor absoluto obtido para a população controlo. Este aumento poderá corresponder a um aumento da produção de monócitos na medula óssea que pode ser devido a um aumento dos níveis plasmáticos dos fatores de estimuladores de colónias como M-CSF e GM-CSF, como consequência da inflamação. De facto, o aumento destes fatores de diferenciação encontra-se associado à progressão de doenças inflamatórias como o caso da Artrite Reumatoide. Foi especulado que GM-CSF pode desempenhar um papel importante na perpetuação dos ciclos das doenças inflamatórias pelo aumento da sobrevivência e diferenciação de macrófagos e granulócitos, que levam a um aumento da resposta inflamatória [220].

A frequência de pDCs no grupo de SSc em *early-stage* é substancialmente elevada quando comparada com os outros grupos e população controlo. Este aumento pode ser associado à atividade da doença, uma vez que o envolvimento desta subpopulação na sua fisiopatologia encontra-se descrito na literatura. Mais propriamente, níveis elevados de IFN- α são responsáveis pela mobilização de granulócitos e monócitos para o local do dano no estadio inicial da SSc. Deste modo, considera-se que na atividade da doença ocorre um aumento da hematopoiese desta linhagem.

Em contrapartida, a subpopulação de monócitos CD14⁺CD16⁺ encontra-se aumentada ao longo dos anos, o mesmo observado para a subpopulação de DCs CD16⁺. O aumento destas subpopulações em doentes com SSc diagnosticada há mais de 10 anos poderá dever-se ao aumento de lesões ao longo do tempo, ocorrendo assim mais taxa de diferenciação de monócitos para macrófagos e para células dendríticas.

No conjunto, verifica-se que existe um aumento da inflamação em doentes com SSc, onde o comprometimento do sistema do complemento e a deposição de imunocomplexos pode ser pelo menos em parte por esta inflamação. Os corpos apoptóticos são as principais fontes de autoantígenos, e a rápida eliminação é essencial para prevenir respostas autoimunes. A ativação do sistema do complemento está

envolvida na tolerância periférica a autoantígenos encontrados em células apoptóticas uma vez que promovem a sua clearance. Contudo, no âmbito de outras doenças autoimunes como SLE, deficiências no sistema do complemento parecem estar associadas ao aparecimento das mesmas. O comprometimento deste mecanismo pode também estar na origem da SSc e deste modo, envolvido no aumento observado da inflamação.

B. Expressão de citocinas e quimocinas em monócitos e células dendríticas no sangue periférico de doentes com SSc

As citocinas são proteínas/peptídeos extracelulares que permitem interações e comunicações entre os vários tipos de células envolvidas na resposta imune. Por sua vez, as quimocinas correspondem uma classe de citocinas com capacidade quimiotática. Deste modo, ao modularem a atividade funcional de células e tecidos durante condições normais ou patológicas, as citocinas apresentam-se como bons alvos de estudos para a compreensão dos mecanismos subjacentes à SSc.

O estudo da frequência de células a produzir estas proteínas demonstrou que, no geral, a frequência de monócito, DC CD16⁺ e DC mielóide, em doentes com SSc, a produzir citocinas e quimocinas *in vitro* é superior do que a observada para a população controlo. Por outro, a diminuição da intensidade de expressão destas moléculas nas células de doentes com SSc sugere que as mesmas encontram-se menos suscetíveis a estímulo em comparação a células de indivíduos saudáveis. De fato, as células presentes na amostra sanguínea podem já ter realizado a sua função nos tecidos periféricos e deste modo ocorre uma diminuição da intensidade de moléculas expressas na célula por desgaste das suas funções.

No que se refere ao estudo da IL-6, alterações significativas na frequência de monócitos e dendríticas a produzir esta citocina pro-inflamatória não foram registadas. Na literatura, aumentos de IL-6 no soro encontram-se descritos em doentes com SSc e são normalmente associados à fisiopatologia da doença, nomeadamente na diferenciação de linfócitos T em Th17 (na presença de outras moléculas sinalizadoras), inflamação e fibrose, pela estimulação da produção de colagénio. Deste modo, aumento de IL-6 descrito no soro de doentes com SSc pode ser responsável pela ação de outras linhas celulares, como linfócitos Th2 e neutrófilos.

Relativamente à quimocina IL-8 ou CXCL8, verificou-se um aumento significativo da frequência de monócitos e DCs CD16⁺, após estimulação *in vitro*, a produzir IL-8, principalmente no grupo de doentes com o subtipo difuso e no grupo de doentes com

Fibrose Pulmonar, em comparação à população controlo. Considerando que a IL-8 é uma quimocina envolvida no recrutamento de neutrófilos, estimulação da angiogénese e aumento de permeabilidade vascular nas células epiteliais, o aumento significativo em doentes com fibrose (comparados com a população controlo e com doentes sem fibrose) pode ser indicador da severidade da doença. Estudos realizados no fluido de lavagem broncoalveolar de doentes com SSc demonstraram o aumento de IL-8 nestes doentes em comparação com a população controlo, podendo deste modo associar o aumento da frequência de monócitos e DCs a produzir a quimocina com o envolvimento fibrótico dos pulmões [221].

No que se refere à quimocina CCL4, foi observado o aumento significativo da frequência de células a produzir, nomeadamente as DCs CD16⁺ e mielóides. Este aumento foi observado no grupo de doentes com o subtipo difuso e no grupo com Fibrose Pulmonar, com e sem estimulação *in vitro*. Os doentes com DU demonstram também este aumento mas apenas após estímulo *in vitro*. A CCL4 é uma quimocina envolvida no recrutamento de granulócitos e também envolvida na modulação da resposta humoral e celular uma vez que induz a diferenciação de linfócitos Th em Th1 e a produção de imunoglobulinas [222]. Considerando que a SSc é uma doença onde se observa uma resposta imune exacerbada contra os antígenos do próprio, pode ser assumido que as DCs desempenham um papel importante na indução desta resposta.

No que refere a quimocina CXCL10, verifica-se um aumento da frequência de células a produzir CXCL10 principalmente em doentes do subtipo limitado e em doentes sem fibrose pulmonar. O CXCL10 é uma quimocina associada à quimioatração de linfócitos T via CXCR3 e, no âmbito da SSc, estudos demonstram que elevados níveis desta quimocina estão associados a fenótipos clínicos mais severos como envolvimento pulmonar e renal [223]. Contudo, no estudo realizado não foi visível essa ligação.

Consoante os anos da doença, diferenças estatisticamente significativas foram registadas para a frequência de células (monócitos, DC CD16⁺ e DC mielóide) a produzir IL-6 e IL-8, cujos valores aumentavam sucessivamente ao longo dos três grupos. Tal como referido anteriormente, este aumento pode estar relacionado com o aumento da lesão tecidual e consequente resposta inflamatória.

C. Expressão de ICAM-1 em monócitos e células dendríticas no sangue periférico de doentes com SSc

Tanto os monócitos como as dendríticas expressam ICAM-1 à sua superfície, contudo a intensidade de expressão pode variar de acordo com o ambiente imunológico.

Assim, a intensidade de expressão de ICAM-1 em monócitos e DCs foi analisada no sangue periférico de doentes com SSc e os resultados demonstraram uma diminuição significativa de ICAM-1, tanto em monócitos como em DCs, no grupo de doentes com o subtipo difuso quando comparado com o grupo de doentes do subtipo limitado.

A ICAM-1 ou CD54 é uma proteína transmembranar envolvida na migração endotelial dos leucócitos para os locais de inflamação e nas interações entre APCs e linfócitos T. Sob a ação de proteases, o domínio extracelular da ICAM-1 pode ser clivado e consequentemente originar a forma solúvel da molécula – sICAM-1 – libertada deste modo para o meio extracelular. Níveis elevados da sICAM-1 têm sido descritos no soro de doentes com doenças cardiovasculares, cancro e doenças autoimunes [224].

No que diz respeito à SSc, *Ihn e colaboradores*[225] descreveram o aumento da sICAM-1 no soro de doentes com SSc em comparação a uma população controlo, significativamente superior no soro de doentes do subtipo difuso. Correlacionando estas evidências com a diminuição da expressão de CD54 em monócitos e dendríticas, nos doentes com dSSc, pode-se considerar que ocorreu um aumento da clivagem de ICAM-1 da membrana destas células e deste modo no aumento de sICAM-1 no soro, cuja finalidade é a ativação de outras células e contribuir na resposta imune. Considerando que as diferenças foram encontradas entre os grupos de doentes com subtipos diferentes, é possível especular que se verifique um aumento de sICAM-1 no soro de indivíduos com a forma mais severa da doença.

Quando analisada a expressão da molécula ICAM-1, em monócitos e DCs, de acordo com os anos a que a doença foi diagnosticada, verificou-se uma variação destes valores sem significado estatístico.

VI. Conclusão

Os resultados mais relevantes observados neste estudo são o aumento da frequência e valor absoluto de monócitos CD16⁺ e DCs CD16⁺ em doentes com SSc, sobretudo na presença de úlceras digitais e ao longo do tempo, o que parece significar que estas células podem ser bons marcadores periféricos da severidade da doença.

Neste mesmo estudo, observou-se um aumento da frequência de monócitos e células dendríticas (CD16⁺ e mielóides) a produzir IL-8 e CCL4 em doentes com SSc, principalmente na presença de fibrose pulmonar e com o subtipo difuso, o que claramente coloca estas células com um papel relevante na fisiopatologia desta doença.

Por fim, a diminuição de ICAM-1 expressa em monócitos e DCs em doentes do subtipo difuso poderá significar o aumento sICAM-1 no soro descrito na literatura, e deste modo, poderão eventualmente ser aplicados como biomarcadores da severidade da doença.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., e Pillai, S., *Properties and overview of immune responses*, in *Cellular and molecular immunology*. 2007, Saunders Elsevier: Philadelphia. p. 3 - 17.
2. Arosa, F.A., Cardoso, E.M., e Pacheco, F.C., *Processamento e apresentação de antígenos no contexto de MHC*, in *Fundamentos de Imunologia*, F.A. Arosa, Editor. 2007, Lidel: Lisboa. p. 81 - 95.
3. Kindt, T.J., Osborne, B.A., e Goldsby, R.A., *Antigen processing and presentation*, in *Kuby Immunology*. 2006, W. H. Freeman & Company: New York. p. 185 - 197.
4. Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., e Longo, D.L., *Introduction to the immune system*, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, B.F. Haynes e A.S. Fauci, Editors. 2005, McGraw-Hill: New York. p. 1907 - 1930.
5. von Andrian, U.H. e Mackay, C.R., *T-cell function and migration. Two sides of the same coin*. N Engl J Med, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
6. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., e Pillai, S., *Antigen processing and presentation to T lymphocytes*, in *Cellular and molecular immunology*. 2007, Saunders Elsevier: Philadelphia. p. 113 - 136.
7. Friedl, P., den Boer, A.T., e Gunzer, M., *Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 532-545.
8. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
9. Palm, N.W. e Medzhitov, R., *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 221-33.
10. Akira, S., Uematsu, S., e Takeuchi, O., *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
11. Cooper, M.D. e Alder, M.N., *The evolution of adaptive immune systems*. Cell, 2006. **124**(4): p. 815-22.
12. Iwasaki, A. e Medzhitov, R., *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
13. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
14. Watts, C., West, M.A., e Zaru, R., *TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(1): p. 124-30.
15. Kawai, T. e Akira, S., *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 24-32.

16. Banchereau, J. e Steinman, R.M., *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
17. Gordon, S., *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response*. Cell, 2002. **111**(7): p. 927-30.
18. Mellman, I., Turley, S.J., e Steinman, R.M., *Antigen processing for amateurs and professionals*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(6): p. 231-7.
19. Trombetta, E.S. e Mellman, I., *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 975-1028.
20. Larsson, M., Fonteneau, J.F., e Bhardwaj, N., *Dendritic cells resurrect antigens from dead cells*. Trends Immunol, 2001. **22**(3): p. 141-8.
21. Gruen, J.R. e Weissman, S.M., *Evolving views of the major histocompatibility complex*. Blood, 1997. **90**(11): p. 4252-65.
22. Jones, E.Y., Fugger, L., Strominger, J.L., e Siebold, C., *MHC class II proteins and disease: a structural perspective*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 271-82.
23. Traherne, J.A., *Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies*. Int J Immunogenet, 2008. **35**(3): p. 179-92.
24. Rocha, N. e Neefjes, J., *MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation*. EMBO J, 2008. **27**(1): p. 1-5.
25. Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R.C., Bruford, E.A., Khodiyar, V.K., Lush, M.J., Povey, S., Jr, C.C.T., Wright, M.W., Wain, H.M., Trowsdale, J., Ziegler, A., e Beck, S., *Gene map of the extended human MHC*. Nature Reviews Genetics, 2004. **5**: p. 889 - 899.
26. Norcross, M.A., *A synaptic basis for T-lymphocyte activation*. Ann Immunol (Paris), 1984. **135D**(2): p. 113-34.
27. Huppa, J.B. e Davis, M.M., *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 973-83.
28. Gutcher, I. e Becher, B., *APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1119-27.
29. Gunzer, M., Weishaupt, C., Hillmer, A., Basoglu, Y., Friedl, P., Dittmar, K.E., Kolanus, W., Varga, G., e Grabbe, S., *A spectrum of biophysical interaction modes between T cells and different antigen-presenting cells during priming in 3-D collagen and in vivo*. Blood, 2004. **104**: p. 2801 - 2809.
30. Auffray, C., Sieweke, M.H., e Geissmann, F., *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.

31. Gordon, S. e Taylor, P.R., *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
32. Robbins, C.S. e Swirski, F.K., *The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(16): p. 2685-93.
33. Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., e Pamer, E.G., *Monocyte-mediated defense against microbial pathogens*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 421-52.
34. Saha, P. e Geissmann, F., *Toward a functional characterization of blood monocytes*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(1): p. 2-4.
35. Woollard, K.J. e Geissmann, F., *Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(2): p. 77-86.
36. Slaney, C.Y., Toker, A., La Flamme, A., Backstrom, B.T., e Harper, J.L., *Naive blood monocytes suppress T-cell function. A possible mechanism for protection from autoimmunity*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(1): p. 7-13.
37. Evans, H.G., Gullick, N.J., Kelly, S., Pitzalis, C., Lord, G.M., Kirkham, B.W., e Taams, L.S., *In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6232-7.
38. Serbina, N.V. e Pamer, E.G., *Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 311-7.
39. Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Guernonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., e Nussenzweig, M., *The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 676-83.
40. Strauss-Ayali, D., Conrad, S.M., e Mosser, D.M., *Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(2): p. 244-52.
41. Hume, D.A., *The mononuclear phagocyte system*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 49-53.
42. Chow, A., Brown, B.D., e Merad, M., *Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 788-98.
43. Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., e Ley, K., *Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-661.
44. Dai, X.M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., e Stanley, E.R., *Targeted disruption of the mouse colony-stimulating*

- factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects.* Blood, 2002. **99**(1): p. 111-20.
45. Dakic, A., Metcalf, D., Rago, L.D., Mifsud, S., Wu, L., e Nutt, S.L., *Pu.1 regulates the commitment of adult hemotopoietic progenitors and restricts granulopoiesis.* J Exp Med, 2005. **201**: p. 1487 - 1502.
 46. Shi, C. e Pamer, E.G., *Monocyte recruitment during infection and inflammation.* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-74.
 47. Imhof, B.A. e Aurrand-Lions, M., *Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 432-44.
 48. "Inflammation": <http://medicinembbs.blogspot.com/2011/02/inflammation.html> site revisto em 23-12-2011
 49. Ingersoll, M.A., Platt, A.M., Potteaux, S., e Randolph, G.J., *Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation.* Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 470-7.
 50. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., e Nourshargh, S., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
 51. Yasaka, T., Mantich, N.M., Boxer, L.A., e Baehner, R.L., *Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets.* J Immunol, 1981. **127**(4): p. 1515-8.
 52. Akiyama, Y., Miller, P.J., Thurman, G.B., Neubauer, R.H., Oliver, C., Favilla, T., Beman, J.A., Oldham, R.K., e Stevenson, H.C., *Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity.* J Clin Invest, 1983. **72**(3): p. 1093-105.
 53. Weiner, R.S. e Mason, R.R., *Subfractionation of human blood monocyte subsets with Percoll.* Exp Hematol, 1984. **12**(10): p. 800-4.
 54. Figdor, C.G., Bont, W.S., Touw, I., de Roos, J., Roosnek, E.E., e de Vries, J.E., *Isolation of functionally different human monocytes by counterflow centrifugation elutriation.* Blood, 1982. **60**(1): p. 46-53.
 55. Elias, J.A., Chien, P., Gustilo, K.M., e Schreiber, A.D., *Differential interleukin-1 elaboration by density-defined human monocyte subpopulations.* Blood, 1985. **66**(2): p. 298-301.
 56. Grage-Griebenow, E., Flad, H.D., e Ernst, M., *Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets.* J Leukoc Biol, 2001. **69**(1): p. 11-20.

57. Zembala, M., Uracz, W., Ruggiero, I., Mytar, B., e Pryjma, J., *Isolation and functional characteristics of FcR+ and FcR- human monocyte subsets*. J Immunol, 1984. **133**(3): p. 1293-9.
58. Grage-Griebenow, E., Lorenzen, D., Fetting, R., Flad, H.D., e Ernst, M., *Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity*. Eur J Immunol, 1993. **23**(12): p. 3126-35.
59. Passlick, B., Flieger, D., e Ziegler-Heitbrock, H.W., *Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood*. Blood, 1989. **74**(7): p. 2527-34.
60. Ziegler-Heitbrock, H., Fingerle, G., Strobel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schutt, C., Passlick, B., e Pforte, A., *The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages*. Eur J Immunol, 1993. **23**: p. 2053 - 2058.
61. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., e Lutz, M.B., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
62. Belge, K.U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., e Ziegler-Heitbrock, L., *The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3536-42.
63. Szaflarska, A., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Weglarczyk, K., Ruggiero, I., Hajto, B., e Zembala, M., *Antitumor response of CD14⁺/CD16⁺ monocyte subpopulation*. Exp Hematol, 2004. **32**(8): p. 748-55.
64. Serbina, N.V., Cherny, M., Shi, C., Bleau, S.A., Collins, N.H., Young, J.W., e Pamer, E.G., *Distinct responses of human monocyte subsets to Aspergillus fumigatus conidia*. J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2678-87.
65. Grage-Griebenow, E., Zawatzky, R., Kahlert, H., Brade, L., Flad, H., e Ernst, M., *Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes*. Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 48-56.
66. Skrzeczynska-Moncznik, J., Bzowska, M., Loseke, S., Grage-Griebenow, E., Zembala, M., e Pryjma, J., *Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10*. Scand J Immunol, 2008. **67**(2): p. 152-9.

67. Fingerle-Rowson, G., Auers, J., Kreuzer, E., Fraunberger, P., Blumenstein, M., e Ziegler-Heitbrock, L.H., *Expansion of CD14⁺CD16⁺ monocytes in critically ill cardiac surgery patients*. Inflammation, 1998. **22**(4): p. 367-79.
68. Ziegler-Heitbrock, H.W., *Definition of human blood monocytes*. Journal of leukocyte biology, 2000. **67**(5): p. 603-606.
69. Ziegler-Heitbrock, H.W., Strobel, M., Kieper, D., Fingerle, G., Schlunck, T., Petersmann, I., Ellwart, J., Blumenstein, M., e Haas, J.G., *Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations*. Blood, 1992. **79**(2): p. 503-11.
70. Geissmann, F., Jung, S., e Littman, D.R., *Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
71. Fingerle-Rowson, G., Auers, J., Kreuzer, E., Fraunberger, P., Blumenstein, M., e Zeigler-Heitbrock, L.H., *Expansion of CD14⁺CD16⁺ monocytes in critically ill cardiac surgery patients*. Inflammation, 1998. **22**: p. 367 - 379.
72. Horelt, A., Belge, K.U., Steppich, B., Prinz, J., e Ziegler-Heitbrock, L., *The CD14⁺CD16⁺ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production*. Eur J Immunol, 2002. **32**(5): p. 1319-27.
73. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 271-96.
74. Liu, K. e Nussenzweig, M.C., *Development and homeostasis of dendritic cells*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2099-102.
75. Steinman, R.M., Hawiger, D., e Nussenzweig, M.C., *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
76. Steinman, R.M. e Cohn, Z.A., *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
77. Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., Littman, D.R., e Reinecker, H.-C., *CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance*. Science, 2005. **307**(5707): p. 254-258.
78. Wan, H. e Dumasquier, M., *Dendritic cells in vivo and in vitro*. Cell Mol Immunol, 2005. **2**(1): p. 28-35.
79. Steinman, R.M. e Banchereau, J., *Taking dendritic cells into medicine*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 419-26.

80. Steinman, R.M. e Cohn, Z.A., *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro*. J Exp Med, 1974. **139**(2): p. 380-97.
81. Steinman, R.M., Lustig, D.S., e Cohn, Z.A., *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo*. J Exp Med, 1974. **139**(6): p. 1431-45.
82. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-87.
83. Sato, K. e Fujita, S., *Dendritic cells: nature and classification*. Allergol Int, 2007. **56**(3): p. 183-91.
84. Seitz, H.M. e Matsushima, G.K., *Dendritic cells in systemic lupus erythematosus*. Int Rev Immunol, 2010. **29**(2): p. 184-209.
85. Shortman, K. e Naik, S.H., *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
86. Merad, M. e Manz, M.G., *Dendritic cell homeostasis*. Blood, 2009. **113**(15): p. 3418-27.
87. Liu, K. e Nussenzweig, M.C., *Origin and development of dendritic cells*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 45-54.
88. Wu, L. e Liu, Y.J., *Development of dendritic-cell lineages*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 741-50.
89. Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., e Shortman, K., *The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 47-58.
90. Wu, L., Vremec, D., Ardavin, C., Winkel, K., Suss, G., Georgiou, H., Maraskovsky, E., Cook, W., e Shortman, K., *Mouse thymus dendritic cells: kinetics of development and changes in surface markers during maturation*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 418-25.
91. Wu, L., Li, C.L., e Shortman, K., *Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 903-911.
92. Shortman, K. e Liu, Y.J., *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
93. McKenna, H., Stocking, K., Miller, R., Brasel, K., Smedt, T.D., Marackovsky, E., Maliszewski, C., Lynch, D., Smith, J., Pulendran, B., Roux, E., e Teepe, M., *Mice*

- lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells.* Blood, 2000. **34**89 - **34**97.
94. Laouar, Y., Welte, T., Fu, X.-Y., e Flavell, R.A., *STAT3 Is Required for Flt3L-Dependent Dendritic Cell Differentiation.* Immunity, 2003. **19**(6): p. 903-912.
 95. Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., e McKenna, H.J., *Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified.* J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1953-1962.
 96. Onai, N., Obata-Onai, A., Tussiwand, R., Lanzavecchia, A., e Manz, M.G., *Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development.* J Exp Med, 2006. **203**(1): p. 227-38.
 97. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., e Palucka, K., *Immunobiology of dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
 98. Ueno, H., Schmitt, N., Palucka, A.K., e Banchereau, J., *Dendritic cells and humoral immunity in humans.* Immunol Cell Biol, 2010. **88**(4): p. 376-80.
 99. Morel, P.A. e Turner, M.S., *Dendritic cells and the maintenance of self-tolerance.* Immunol Res, 2011. **50**(2-3): p. 124-9.
 100. Agrawal, A. e Gupta, S., *Impact of aging on dendritic cell functions in humans.* Ageing Res Rev, 2011. **10**(3): p. 336-45.
 101. Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M.C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A., e Vicari, A., *Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines.* Springer Semin Immunopathol, 2000. **22**(4): p. 345-69.
 102. Sagar, D., Foss, C., El Baz, R., Pomper, M.G., Khan, Z.K., e Jain, P., *Mechanisms of Dendritic Cell Trafficking Across the Blood-brain Barrier.* J Neuroimmune Pharmacol, 2011.
 103. Sanchez-Sanchez, N., Riol-Blanco, L., e Rodriguez-Fernandez, J.L., *The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells.* J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5153-9.
 104. Shakhar, G., Lindquist, R.L., Skokos, D., Dudziak, D., Huang, J.H., Nussenzweig, M.C., e Dustin, M.L., *Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo.* Nat Immunol, 2005. **6**(7): p. 707-14.

105. Bousso, P., *T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 675-84.
106. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.
107. Fayette, J., Dubois, B., Vandenabeele, S., Bridon, J.M., Vanbervliet, B., Durand, I., Banchereau, J., Caux, C., e Briere, F., *Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2*. J Exp Med, 1997. **185**(11): p. 1909-18.
108. Wang, X., Cho, B., Suzuki, K., Xu, Y., Green, J.A., An, J., e Cyster, J.G., *Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers*. J Exp Med, 2011. **208**(12): p. 2497-510.
109. Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C., e MacPherson, G.G., *Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1313-9.
110. Steinman, R.M., *Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1155-9.
111. Zanoni, I. e Granucci, F., *The regulatory role of dendritic cells in the induction and maintenance of T-cell tolerance*. Autoimmunity, 2011. **44**(1): p. 23-32.
112. Darrasse-Jeze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K.H., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., e Nussenzweig, M.C., *Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo*. J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 1853-62.
113. Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., e Pamer, E.G., *TNF/*i*NOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 59-70.
114. MacDonald, K.P., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., e Hart, D.N., *Characterization of human blood dendritic cell subsets*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4512-20.
115. Mortellaro, A., Wong, S.C., Fric, J., e Ricciardi-Castagnoli, P., *The need to identify myeloid dendritic cell progenitors in human blood*. Trends Immunol, 2010. **31**(1): p. 18-23.
116. Bender, J.G., Unverzagt, K.L., Walker, D.E., Lee, W., Van Epps, D.E., Smith, D.H., Stewart, C.C., e To, L.B., *Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry*. Blood, 1991. **77**(12): p. 2591-6.

117. Santiago-Schwarz, F., Belilos, E., Diamond, B., e Carsons, S.E., *TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages*. J Leukoc Biol, 1992. **52**(3): p. 274-81.
118. Lindstedt, M., Lundberg, K., e Borrebaeck, C.A., *Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 4839-46.
119. Zaba, L.C., Krueger, J.G., e Lowes, M.A., *Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(2): p. 302-8.
120. Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S., e Ikehara, S., *A CD1a⁺/CD11c⁺ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1409-19.
121. Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., Vulink, A.J., Hart, D.N., e Radford, K.J., *Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens*. J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1247-60.
122. Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., Le Moine, A., Faure, F., Donckier, V., Sancho, D., Cerundolo, V., Bonnet, D., e Reis e Sousa, C., *Characterization of human DNGR-1⁺ BDCA3⁺ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha⁺ dendritic cells*. J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1261-71.
123. Sallusto, F. e Lanzavecchia, A., *Monocytes join the dendritic cell family*. Cell, 2010. **143**(3): p. 339-40.
124. Sallusto, F. e Lanzavecchia, A., *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
125. Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R.M., e Bhardwaj, N., *Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood*. J Immunol Methods, 1996. **196**(2): p. 121-35.
126. Randolph, G.J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R.M., e Muller, W.A., *Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking*. Science, 1998. **282**(5388): p. 480-3.

127. Cai, Z., Brunmark, A., Jackson, M.R., Loh, D., Peterson, P.A., e Sprent, J., *Transfected Drosophila cells as a probe for defining the minimal requirements for stimulating unprimed CD8+ T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(25): p. 14736-41.
128. Sprent, J., *Antigen-presenting cells. Professionals and amateurs*. Curr Biol, 1995. **5**(10): p. 1095-7.
129. Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., e Geissmann, F., *A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells*. Science, 2006. **311**(5757): p. 83-7.
130. Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., e Jung, S., *Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 171-80.
131. Morgado, J.M., Pratas, R., Laranjeira, P., Henriques, A., Crespo, I., Regateiro, F., e Paiva, A., *The phenotypical and functional characteristics of cord blood monocytes and CD14(-/low)/CD16(+) dendritic cells can be relevant to the development of cellular immune responses after transplantation*. Transpl Immunol, 2008. **19**(1): p. 55-63.
132. Ziegler-Heitbrock, L., *The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(3): p. 584-92.
133. Cheong, C., Matos, I., Choi, J.H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., Koh, H., Rodriguez, A., Idoyaga, J., Pack, M., Velinzon, K., Park, C.G., e Steinman, R.M., *Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas*. Cell, 2010. **143**(3): p. 416-29.
134. Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., e Liu, Y.J., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
135. Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., e Colonna, M., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med, 1999. **5**(8): p. 919-23.
136. Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., e Sisirak, V., *Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 163-83.
137. Lande, R. e Gilliet, M., *Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 89-103.

138. Chicha, L., Jarrossay, D., e Manz, M.G., *Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations*. J Exp Med, 2004. **200**(11): p. 1519-24.
139. Sozzani, S., Vermi, W., Del Prete, A., e Facchetti, F., *Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease*. Trends Immunol, 2010. **31**(7): p. 270-7.
140. de Heer, H.J., Hammad, H., Soullie, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A., Hoogsteden, H.C., e Lambrecht, B.N., *Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen*. J Exp Med, 2004. **200**(1): p. 89-98.
141. Gonzalez, B., Guerra, C., Morris, D., Gray, D., e Venketaraman, V., *Dendritic cells in infectious disease, hypersensitivity, and autoimmunity*. International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research, 2010. **2**: p. 137 - 147.
142. Steinman, R.M. e Idoyaga, J., *Features of the dendritic cell lineage*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 5-17.
143. Colonna, M., Trinchieri, G., e Liu, Y.J., *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1219-26.
144. Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., e Liu, Y.J., *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1101-11.
145. Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., e Liu, Y.J., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
146. Dzionek, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y., e Schmitz, J., *BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1823-34.
147. Cao, W., Rosen, D.B., Ito, T., Bover, L., Bao, M., Watanabe, G., Yao, Z., Zhang, L., Lanier, L.L., e Liu, Y.J., *Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1399-405.

148. Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., e Schmitz, J., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6037-46.
149. Gilliet, M., Cao, W., e Liu, Y.J., *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 594-606.
150. Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B., e Kono, D.H., *Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 307-36.
151. Santini, S.M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T., e Belardelli, F., *Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice*. J Exp Med, 2000. **191**(10): p. 1777-88.
152. Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., e Tough, D.F., *Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon*. Nat Immunol, 2003. **4**(10): p. 1009-15.
153. Hoeffel, G., Ripoche, A.C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.G., Gannage, M., Caillat-Zucman, S., Casartelli, N., Schwartz, O., De la Salle, H., Hanau, D., Hosmalin, A., e Maranon, C., *Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells*. Immunity, 2007. **27**(3): p. 481-92.
154. Marrack, P., Kappler, J., e Mitchell, T., *Type I interferons keep activated T cells alive*. J Exp Med, 1999. **189**(3): p. 521-30.
155. Sapozhnikov, A., Fischer, J.A., Zaft, T., Krauthgamer, R., Dzionek, A., e Jung, S., *Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1923-33.
156. Santodonato, L., D'Agostino, G., Nisini, R., Mariotti, S., Monque, D.M., Spada, M., Lattanzi, L., Perrone, M.P., Andreotti, M., Belardelli, F., e Ferrantini, M., *Monocyte-derived dendritic cells generated after a short-term culture with IFN-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate a potent Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cell response*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5195-202.
157. Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., e Trinchieri, G., *The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 727-34.

158. Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.P., Chalouni, C., Pascual, V., e Banchereau, J., *Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6*. Immunity, 2003. **19**(2): p. 225-34.
159. Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., Jessberger, R., Trinchieri, G., Lira, S.A., Randolph, G.J., e Bromberg, J.S., *Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts*. Nat Immunol, 2006. **7**(6): p. 652-62.
160. Jaehn, P.S., Zaenker, K.S., Schmitz, J., e Dzionek, A., *Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon*. Eur J Immunol, 2008. **38**(7): p. 1822-32.
161. Salio, M., Palmowski, M.J., Atzberger, A., Hermans, I.F., e Cerundolo, V., *CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens*. J Exp Med, 2004. **199**(4): p. 567-79.
162. Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sorensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., e Connolly, J.E., *Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 551-7.
163. Sadaka, C., Marloie-Provost, M.A., Soumelis, V., e Benaroch, P., *Developmental regulation of MHC II expression and transport in human plasmacytoid-derived dendritic cells*. Blood, 2009. **113**(10): p. 2127-35.
164. Waldner, H., *The role of innate immune responses in autoimmune disease development*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(5): p. 400-4.
165. Balague, C., Kunkel, S.L., e Godessart, N., *Understanding autoimmune disease: new targets for drug discovery*. Drug Discov Today, 2009. **14**(19-20): p. 926-34.
166. Lleo, A., Invernizzi, P., Gao, B., Podda, M., e Gershwin, M.E., *Definition of human autoimmunity--autoantibodies versus autoimmune disease*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(5): p. A259-66.
167. Gu, Y.S., Kong, J., Cheema, G.S., Keen, C.L., Wick, G., e Gershwin, M.E., *The immunobiology of systemic sclerosis*. Semin Arthritis Rheum, 2008. **38**(2): p. 132-60.
168. Katsumoto, T.R., Whitfield, M.L., e Connolly, M.K., *The pathogenesis of systemic sclerosis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 509-37.

169. Derrett-Smith, E.C. e Denton, C.P., *Systemic sclerosis: clinical features and management*. Medicine, 2010. **38**(2): p. 109-115.
170. Derk, C.T. e Jimenez, S.A., *Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis*. Autoimmun Rev, 2003. **2**(4): p. 181-91.
171. Grossman, C., Dovrish, Z., Shoenfeld, Y., e Amital, H., *Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis?* Autoimmun Rev, 2011. **10**(5): p. 244-7.
172. Zakrzewska, K., Corcioli, F., Carlsen, K.M., Giuggioli, D., Fanci, R., Rinieri, A., Ferri, C., e Azzi, A., *Human parvovirus B19 (B19V) infection in systemic sclerosis patients*. Intervirology, 2009. **52**(5): p. 279-82.
173. Namboodiri, A.M., Rocca, K.M., e Pandey, J.P., *IgG antibodies to human cytomegalovirus late protein UL94 in patients with systemic sclerosis*. Autoimmunity, 2004. **37**(3): p. 241-4.
174. Muryoi, T., Kasturi, K.N., Kafina, M.J., Saitoh, Y., Usuba, O., Perlish, J.S., Fleischmajer, R., e Bona, C.A., *Self reactive repertoire of tight skin mouse: immunochemical and molecular characterization of anti-topoisomerase I autoantibodies*. Autoimmunity, 1991. **9**(2): p. 109-17.
175. Gasbarrini, A., Massari, I., Serricchio, M., Tondi, P., De Luca, A., Franceschi, F., Ojetti, V., Dal Lago, A., Flore, R., Santoliquido, A., Gasbarrini, G., e Pola, P., *Helicobacter pylori eradication ameliorates primary Raynaud's phenomenon*. Dig Dis Sci, 1998. **43**(8): p. 1641-5.
176. Feghali-Bostwick, C., Medsger, T.A., Jr., e Wright, T.M., *Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(7): p. 1956-63.
177. Agarwal, S.K. e Reveille, J.D., *The genetics of scleroderma (systemic sclerosis)*. Curr Opin Rheumatol, 2010. **22**(2): p. 133-8.
178. Geyer, M. e Muller-Ladner, U., *The pathogenesis of systemic sclerosis revisited*. Clin Rev Allergy Immunol, 2011. **40**(2): p. 92-103.
179. Abraham, D.J., Krieg, T., Distler, J., e Distler, O., *Overview of pathogenesis of systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2009. **48 Suppl 3**: p. iii3-7.
180. Steen, V., Denton, C.P., Pope, J.E., e Matucci-Cerinic, M., *Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2009. **48 Suppl 3**: p. iii19-24.
181. Manetti, M., Guiducci, S., Ibba-Manneschi, L., e Matucci-Cerinic, M., *Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(6A): p. 1241-54.

182. Cambrey, A.D., Harrison, N.K., Dawes, K.E., Southcott, A.M., Black, C.M., du Bois, R.M., Laurent, G.J., e McAnulty, R.J., *Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **11**(4): p. 439-45.
183. Uitto, J. e Kouba, D., *Cytokine modulation of extracellular matrix gene expression: relevance to fibrotic skin diseases*. J Dermatol Sci, 2000. **24 Suppl 1**: p. S60-9.
184. Jelaska, A. e Korn, J.H., *Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(10): p. 2230-9.
185. Sakkas, L.I., Chikanza, I.C., e Platsoucas, C.D., *Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(12): p. 679-85.
186. Katsiari, C.G., Liossis, S.N., e Sfikakis, P.P., *The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: a reappraisal*. Semin Arthritis Rheum, 2010. **39**(6): p. 491-503.
187. Devaraj, S., Glaser, N., Griffen, S., Wang-Polagruto, J., Miguelino, E., e Jialal, I., *Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2006. **55**(3): p. 774-9.
188. Bouma, G., Lam-Tse, W.K., Wierenga-Wolf, A.F., Drexhage, H.A., e Versnel, M.A., *Increased serum levels of MRP-8/14 in type 1 diabetes induce an increased expression of CD11b and an enhanced adhesion of circulating monocytes to fibronectin*. Diabetes, 2004. **53**(8): p. 1979-86.
189. Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., e Banchereau, J., *Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus*. Science, 2001. **294**(5546): p. 1540-3.
190. Izikson, L., Klein, R.S., Luster, A.D., e Weiner, H.L., *Targeting monocyte recruitment in CNS autoimmune disease*. Clin Immunol, 2002. **103**(2): p. 125-31.
191. Sullivan, K.E., Suriano, A., Dietzmann, K., Lin, J., Goldman, D., e Petri, M.A., *The TNFalpha locus is altered in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Immunol, 2007. **123**(1): p. 74-81.
192. Wildenberg, M.E., Welzen-Coppens, J.M., van Helden-Meeuwsen, C.G., Bootsma, H., Vissink, A., van Rooijen, N., van de Merwe, J.P., Drexhage, H.A., e Versnel, M.A., *Increased frequency of CD16+ monocytes and the presence of activated*

- dendritic cells in salivary glands in primary Sjogren syndrome*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(3): p. 420-6.
193. Li, Y., Lee, P.Y., e Reeves, W.H., *Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010. **58**(5): p. 355-64.
 194. Higashi-Kuwata, N., Jinnin, M., Makino, T., Fukushima, S., Inoue, Y., Muchemwa, F.C., Yonemura, Y., Komohara, Y., Takeya, M., Mitsuya, H., e Ihn, H., *Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(4): p. R128.
 195. Martinez, F.O., Helming, L., e Gordon, S., *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 451-83.
 196. Christmann, R.B., Hayes, E., Pendergrass, S., Padilla, C., Farina, G., Affandi, A.J., Whitfield, M.L., Farber, H.W., e Lafyatis, R., *Interferon and alternative activation of monocyte/macrophages in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(6): p. 1718-28.
 197. Yanaba, K., Komura, K., Koderia, M., Matsushita, T., Hasegawa, M., Takehara, K., e Sato, S., *Serum levels of monocyte chemotactic protein-3/CCL7 are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(1): p. 124-6.
 198. Distler, J.H., Jungel, A., Caretto, D., Schulze-Horsel, U., Kowal-Bielecka, O., Gay, R.E., Michel, B.A., Muller-Ladner, U., Kalden, J.R., Gay, S., e Distler, O., *Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(1): p. 214-25.
 199. Distler, J.H., Akhmetshina, A., Schett, G., e Distler, O., *Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2009. **48**(2): p. 98-103.
 200. Torres-Aguilar, H., Blank, M., Jara, L.J., e Shoenfeld, Y., *Tolerogenic dendritic cells in autoimmune diseases: crucial players in induction and prevention of autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2010. **10**(1): p. 8-17.
 201. Jara, L.J., Benitez, G., e Medina, G., *Prolactin, dendritic cells, and systemic lupus erythematosus*. Autoimmun Rev, 2008. **7**(3): p. 251-5.
 202. Ozaki, Y., Amakawa, R., Ito, T., Iwai, H., Tajima, K., Uehira, K., Kagawa, H., Uemura, Y., Yamashita, T., e Fukuhara, S., *Alteration of peripheral blood dendritic*

- cells in patients with primary Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum*, 2001. **44**(2): p. 419-31.
203. Pashenkov, M., Huang, Y.M., Kostulas, V., Haglund, M., Soderstrom, M., e Link, H., *Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. Brain*, 2001. **124**(Pt 3): p. 480-92.
 204. Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Capello, E., Mancardi, G.L., e Aloisi, F., *Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. J Neuropathol Exp Neurol*, 2006. **65**(2): p. 124-41.
 205. Henriques, A., Ines, L., Carvalho, T., Couto, M., Andrade, A., Pedreiro, S., Laranjeira, P., Morgado, J.M., Pais, M.L., da Silva, J.A., e Paiva, A., *Functional characterization of peripheral blood dendritic cells and monocytes in systemic lupus erythematosus. Rheumatol Int*, 2012. **32**(4): p. 863-9.
 206. Ronnblom, L. e Alm, G.V., *A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. J Exp Med*, 2001. **194**(12): p. F59-63.
 207. Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.J., e Gilliet, M., *Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. J Exp Med*, 2005. **202**(1): p. 135-43.
 208. Boniface, K., Blom, B., Liu, Y.J., e de Waal Malefyt, R., *From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited. Immunol Rev*, 2008. **226**: p. 132-46.
 209. Agrawal, A., Tay, J., Ton, S., Agrawal, S., e Gupta, S., *Increased reactivity of dendritic cells from aged subjects to self-antigen, the human DNA. J Immunol*, 2009. **182**(2): p. 1138-45.
 210. van Bon, L., Popa, C., Huijbens, R., Vonk, M., York, M., Simms, R., Hesselstrand, R., Wuttge, D.M., Lafyatis, R., e Radstake, T.R., *Distinct evolution of TLR-mediated dendritic cell cytokine secretion in patients with limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis. Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(8): p. 1539-47.
 211. Eloranta, M.L., Franck-Larsson, K., Lovgren, T., Kalamajski, S., Ronnblom, A., Rubin, K., Alm, G.V., e Ronnblom, L., *Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(7): p. 1396-402.
 212. Broen, J.C.A., Bossini-Castillo, L., van Bon, L., Vonk, M.C., Knaapen, H., Beretta, L., Rueda, B., Hesselstrand, R., Herrick, A., Worthington, J., Hunzelman, N.,

- Denton, C.P., Fonseca, C., Riemekasten, G., Kiener, H.P., Scorza, R., Simeón, C.P., Ortego-Centeno, N., Spanish Systemic Sclerosis, G., Gonzalez-Gay, M.A., Airò, P., Coenen, M.J.H., Martín, J., e Radstake, T.R.D.J., *A rare polymorphism in the gene for Toll-like receptor 2 is associated with systemic sclerosis phenotype and increases the production of inflammatory mediators*. Arthritis & Rheumatism, 2012. **64**(1): p. 264-271.
213. *Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee*. Arthritis Rheum, 1980. **23**(5): p. 581-90.
214. LeRoy, E.C., Black, C., Fleischmajer, R., Jablonska, S., Krieg, T., Medsger, T.A., Jr., Rowell, N., e Wollheim, F., *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis*. J Rheumatol, 1988. **15**(2): p. 202-5.
215. Corriveau, M.P., Boufaied, I., Lessard, J., Chabaud, S., Senecal, J.L., Grodzicky, T., Chartier, S., Raymond, Y., e Moulin, V.J., *The fibrotic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts varies with disease duration and severity of skin involvement: reconstitution of skin fibrosis development using a tissue engineering approach*. J Pathol, 2009. **217**(4): p. 534-42.
216. Kalogerou, A., Gelou, E., Mountantonakis, S., Settas, L., Zafiriou, E., e Sakkas, L., *Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(8): p. 1233-5.
217. Prescott, R.J., Freemont, A.J., Jones, C.J., Hoyland, J., e Fielding, P., *Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma*. J Pathol, 1992. **166**(3): p. 255-63.
218. Whitfield, M.L., Finlay, D.R., Murray, J.I., Troyanskaya, O.G., Chi, J.T., Pergamenschikov, A., McCalmont, T.H., Brown, P.O., Botstein, D., e Connolly, M.K., *Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12319-24.
219. Qian, B.Z. e Pollard, J.W., *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
220. Kopf, M., Bachmann, M.F., e Marsland, B.J., *Averting inflammation by targeting the cytokine environment*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(9): p. 703-18.
221. Bolster, M.B., Ludwicka, A., Sutherland, S.E., Strange, C., e Silver, R.M., *Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis*. Arthritis & Rheumatism, 1997. **40**(4): p. 743-751.

- 222. Lillard, J.W., Jr., Singh, U.P., Boyaka, P.N., Singh, S., Taub, D.D., e McGhee, J.R., *MIP-1alpha and MIP-1beta differentially mediate mucosal and systemic adaptive immunity*. Blood, 2003. **101**(3): p. 807-14.
- 223. Antonelli, A., Ferri, C., Fallahi, P., Ferrari, S.M., Giuggioli, D., Colaci, M., Manfredi, A., Frascerra, S., Franzoni, F., Galetta, F., e Ferrannini, E., *CXCL10 (alpha) and CCL2 (beta) chemokines in systemic sclerosis--a longitudinal study*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(1): p. 45-9.
- 224. Lawson, C. e Wolf, S., *ICAM-1 signaling in endothelial cells*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 22-32.
- 225. Ihn, H., Sato, S., Fujimoto, M., Kikuchi, K., Kadono, T., Tamaki, K., e Takehara, K., *Circulating intercellular adhesion molecule-1 in the sera of patients with systemic sclerosis: enhancement by inflammatory cytokines*. Br J Rheumatol, 1997. **36**(12): p. 1270-5.

ANEXO 1

Tabela 1 – Características clínicas dos doentes com SSc.

	SUBTIPO	
	DIFUSO (n=13)	LIMITADO (n=30)
Contagem de glóbulos brancos (10 ³ cel/ μ L)	9,75 \pm 2,54	7,65 \pm 1,66
Duração da doença:		
Early Stage	23,1% (n=3)	10,0% (n=3)
Mid Stage	53,8% (n=7)	46,7% (n=14)
Late Stage	23,1% (n=3)	43,3% (n=13)
Anticorpos:		
Anticorpos antinucleares isolados	0,00% (n=0)	30,0% (n=9)
Presença do Anticorpo Scl-70	100% (n=13)	0,00% (n=0)
Presença do Anticorpo anti-centrómero	0,00% (n=0)	70,0% (n=21)
Índice de Rodnan modificado	18,8 \pm 10,1	10,4 \pm 6,45
Úlceras ou história	53,8% (n=7)	33,3% (n=10)
Função Pulmonar:		
Hipertensão pulmonar	15,4% (n=2)	6,67% (n=2)
Fibrose pulmonar	61,5% (n=8)	26,7% (n=8)
DLCO	79,5 \pm 19,9	95,6 \pm 19,5
Terapêutica:		
Vasodilatadores	100% (n=13)	100% (n=30)
IECA	30,8% (n=4)	26,7% (n=8)
Corticoides	46,2% (n=6)	43,3% (n=13)
Imunossupressores	0,00% (n=0)	16,7% (n=5)